



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE  
Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská



## **Studium využití záporného korónového výboje a plazmové trysky pro medicínské účely**

## **Study of Negative Corona Discharge and Plasma Jet from the Perspective of its Medical Use**

Bakalářská práce

Autor: **Laura Thonová**  
Vedoucí práce: **Ing. Anna Machková**  
Akademický rok: 2021/2022

- Zadání práce -

- Zadání práce (zadní strana) -

### *Poděkování:*

Chtěla bych zde poděkovat především své školitelce Ing. Anně Machkové za pečlivost, ochotu, vstřícnost a odborné i lidské zázemí při vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu laboratoře na VŠCHT doc. Ing. Vladimíru Scholtzovi, Ph.D. a vedoucí PlasmaLabu na FJFI, ČVUT RNDr. Janě Brotánkové, Ph.D. za poskytnutí prostor, zázemí a odborné asistence pro experimentální výzkum této bakalářské práce. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za obrovskou podporu a trpělivost, kterou mi během psaní této práce poskytli.

### *Čestné prohlášení:*

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jsem pouze podklady uvedené v příloženém seznamu literatury.

Nemám závažný důvod proti použití tohoto školního díla ve smyslu §60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Praze dne 5. ledna 2022

Laura Thonová



*Název práce:*

**Studium využití záporného korónového výboje a plazmové trysky pro medicínské účely**

*Autor:* Laura Thonová

*Obor:* Fyzika a technika termojaderné fúze

*Druh práce:* Bakalářská práce

*Vedoucí práce:* Ing. Anna Machková, Ústav fyziky a měřicí techniky, Fakulta chemicko-inženýrská, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

*Abstrakt:* Plazmová medicína patří v současné době mezi rychle se rozrůstající obory plazmové vědy a plazmatické přístroje jsou tak podrobovány velkému množství jak experimentálních výzkumů, tak i klinických studií. V této práci je diskutováno potenciální využití plazmové trysky MiniJetu PM - 10.R a plazmatického aplikátoru se záporným korónovým výbojem pro medicínské účely. Diskuse je provedena na základě popsání a porovnání fyzikálních a technických parametrů obou zkoumaných přístrojů a jejich baktericidních účinků. K porovnání fyzikálních a technických parametrů obou přístrojů je využita teoretická rešerše plazmové trysky a záporného korónového výboje v kombinaci s technickými specifikacemi obou studovaných přístrojů. Baktericidní účinky zkoumaných přístrojů jsou experimentálně měřeny a porovnány pomocí referenčního protokolu určeného pro srovnání baktericidních účinků různých zdrojů netermálního plazmatu.

*Klíčová slova:* netermální plazma za atmosférického tlaku (NTP), plazmová medicína, plazmová tryska, reaktivní formy kyslíku a dusíku (ROS, RNS), záporný korónový výboj

*Title:*

**Study of Negative Corona Discharge and Plasma Jet from the Perspective of its Medical Use**

*Author:* Laura Thonová

*Abstract:* Plasma medicine is currently one of the fastest growing fields of plasma science, and plasma devices are thus subjected to a large number of both experimental research and clinical studies. This work discusses the potential use of the MiniJet PM - 10.R plasma nozzle and the negative corona discharge plasma applicator for medical purposes. The discussion is based on the description and comparison of physical and technical parameters of both devices and their bactericidal effects. The theoretical search of the plasma nozzle and the negative corona discharge in combination with the technical specifications of both studied devices is used to compare the physical and technical parameters of both devices. The bactericidal effects of the investigated devices are experimentally measured and compared using a reference protocol designed to compare the bactericidal effects of different sources of non-thermal plasma.

*Key words:* negative corona, nonthermal plasma (NTP), plasma jet, plasma medicine, reactive oxygen and nitrogen species (ROS, RNS)

# Obsah

<b>Úvod</b>	<b>7</b>
<b>1 Netermální plazma</b>	<b>8</b>
1.1 Srážky v netermálním plazmatu . . . . .	10
1.1.1 Townsendova teorie elektronových lavin . . . . .	10
1.1.2 Srážky elektronů s částicemi . . . . .	11
1.1.3 Srážky fotonů s částicemi . . . . .	12
1.1.4 Srážky ovlivňující chemické složení plazmatu . . . . .	13
1.1.5 Tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku . . . . .	15
1.2 Využití netermálního plazmatu pro medicínské účely . . . . .	15
<b>2 Zdroje netermálního plazmatu</b>	<b>19</b>
2.1 Dielektrický bariérový výboj . . . . .	20
2.2 Korónový výboj . . . . .	21
2.2.1 Plazmové aplikátory . . . . .	23
2.3 Plazmová tryska . . . . .	23
<b>3 Interakce NTP ve vzduchu s bakteriálními buňkami</b>	<b>27</b>
<b>4 Experimentální část</b>	<b>32</b>
4.1 Parametry použitých plazmatických aplikátorů . . . . .	32
4.2 Referenční protokol . . . . .	35
4.2.1 Použitý mikroorganismus . . . . .	36
4.2.2 Použité mikrobiologické postupy . . . . .	37
<b>5 Výsledky a diskuze</b>	<b>40</b>
5.1 Výsledky experimentální části práce . . . . .	40
5.1.1 Porovnání parametrů studovaných plazmatických aplikátorů . . . . .	40
5.1.2 Baktericidní účinky MiniJetu PM - 10.R a plazmatického aplikátoru PAzk . . . . .	41
5.2 Diskuze . . . . .	44
<b>Závěr</b>	<b>48</b>

# Úvod

Netermální plazma a jeho potenciální využití pro medicínské účely je předmětem vědeckého zkoumání již několik desítek let a jedná se tedy o relativně mladé odvětví vědy [1]. V medicíně si netermální plazma získalo větší pozornost především díky svým baktericidním a hojení stimulujícím účinkům a zasloužilo se tak o vznik oboru plazmové medicíny [2].

Výzkumy na poli plazmové medicíny jsou velice komplexní a vyžadují multioborovou spolupráci především mezi plazmovými fyziky, mikrobiology, chemiky, inženýry a doktory. Na základě snahy o co nejlepší zmapování vlastností netermálního plazmatu, které by mohly být užitečné pro medicínské aplikace, vzniklo již mnoho výzkumů [2], [3], [4] aj. zabírajících se především studiem baktericidních účinků plazmatu, typů výbojů generujících netermální plazma a konkrétních plazmatických aplikátorů.

Motivací této práce je přispět k rozšiřujícímu se množství vědomostí a znalostí o plazmatických aplikátorech využívajících netermální plazma pro medicínské účely.

Cílem této bakalářské práce je diskutovat potenciální využití dvou konkrétních plazmatických aplikátorů: plazmové trysky MiniJet Pm - 10.R a plazmatického aplikátoru využívajícího jako zdroj netermálního plazmatu záporný korónový výboj, pro medicínské účely na základě popsání a porovnání jejich fyzikálních a technických parametrů a baktericidních vlastností. K porovnání obou přístrojů byl vybrán referenční protokol [5], neboť jeho detailně popsaný postup experimentální metody umožňuje srovnání baktericidních účinků napříč různými typy plazmatických aplikátorů. Výsledky této práce tak mohou být validně srovnávány s dalšími výzkumy, jež metod referenčního protokolu využívají, a zformovat tak paletu znalostí o různých typech plazmatických aplikátorů a jejich potenciálnímu medicínskému využití.

Teoretická část práce nejprve představí pojem netermálního plazmatu a jeho charakteristické vlastnosti. Dále bude stručně zmapován vývoj plazmové medicíny a důležité výsledky, které byly na tomto poli získány. Ve druhé kapitole pak bude popsána problematika různých typů zdrojů netermálního plazmatu a plazmatických aplikátorů s důrazem na korónový výboj a plazmové trysky, které jsou předmětem této studie. V závěru teoretické části pak budou nastíněny mechanismy interakce netermálního plazmatu s bakteriálními buňkami, které jsou zatím nedostatečně zmapovány a dosud jsou na toto téma vedeny četné výzkumy [6].

Experimentální část práce se soustředí na popsání fyzikálních a technických parametrů dvou zkoumaných přístrojů, určení jejich baktericidních účinků a jejich vzájemné porovnání. Nejprve budou podrobně popsány parametry obou studovaných přístrojů a následně bude představena experimentální metoda, která byla použita k určení baktericidních účinků obou aplikátorů. Nakonec budou předneseny výsledky experimentální části a provedeno porovnání zkoumaných aplikátorů.

Závěrem práce pak budou získané výsledky vyhodnoceny a budou diskutovány potenciální způsoby využití obou studovaných plazmatických přístrojů pro medicínské účely.

# Kapitola 1

## Netermální plazma

Plazma, tj. čtvrté skupenství hmoty, které tvoří více než 99% veškeré hmoty ve vesmíru [7], je definováno jako: „Kvazineutrální soubor nabitých částic s volnými nosiči nábojů, který vykazuje kolektivní chování.“ [8]. Z hlediska iontové teploty jsou rozlišovány dva základní druhy plazmatu vysokoteplotní a nízkoteplotní plazma. Nízkoteplotní plazma, tj. low-temperature plasma (LTP), je pak dále děleno na termální plazma (TP) a netermální plazma, tj. nonthermal plasma (NTP) [7], viz. tabulka 1.1.

Netermální plazma, často také označováno jako nerovnovážné [9], se na rozdíl od termálního a vysokoteplotního plazmatu nenachází v termodynamické rovnováze (iontová a elektronová teplota se zásadně liší). V rámci NTP je energie elektrického pole primárně užitá na ohřev elektronové složky plazmatu, díky čemuž vznikají vysokoenergetické elektrony. Naproti tomu ionty a neutrální částice si zachovávají nízkou teplotu v rozmezí 300 až  $10^4$  K. Na základně velkého rozdílu v hmotnostech elektronů, iontů a neutrálních částic je pak makroskopická teplota netermálního plazmatu srovnatelná s teplotou iontů, neboť právě ionty při interakci NTP s okolní hmotou předávají okolí energii, čímž se plazma navenek jeví jako studené dosahující přibližně pokojové teploty [7].

Právě tato vlastnost netermálního plazmatu umožňuje jeho široké uplatnění při interakci s termolabilními látkami [3], [9], [10] a [4].

	Nízkoteplotní plazma (LTP)	
	Termální plazma (TP)	Netermální plazma (NTP)
termodynamická rovnováha	lokální (LTE)	ne
teplota	$T_e \approx T_i \approx T_g \leq 2 \cdot 10^4$ K	$T_e \gg T_i \approx T_g = 300$ až $10^4$ K
hustota elektronů	$n_e \geq 10^{20}$ m <sup>-3</sup>	$n_e \approx 10^{10}$ m <sup>-3</sup>
zdroje plazmatu	obloukový výboj, plazmová pochodeň (plasma torch), radiofrekvenční vázaný indukční výboj...	korónový výboj, dielektrický bariérový výboj, plazmová tryska (plasma jet), mikrodutinový katodový výboj...
využití	plazmové zpracování materiálu, ošetřování odpadu plazmatem...	medicínské účely, dezinfekce povrchů, plazmochemie...

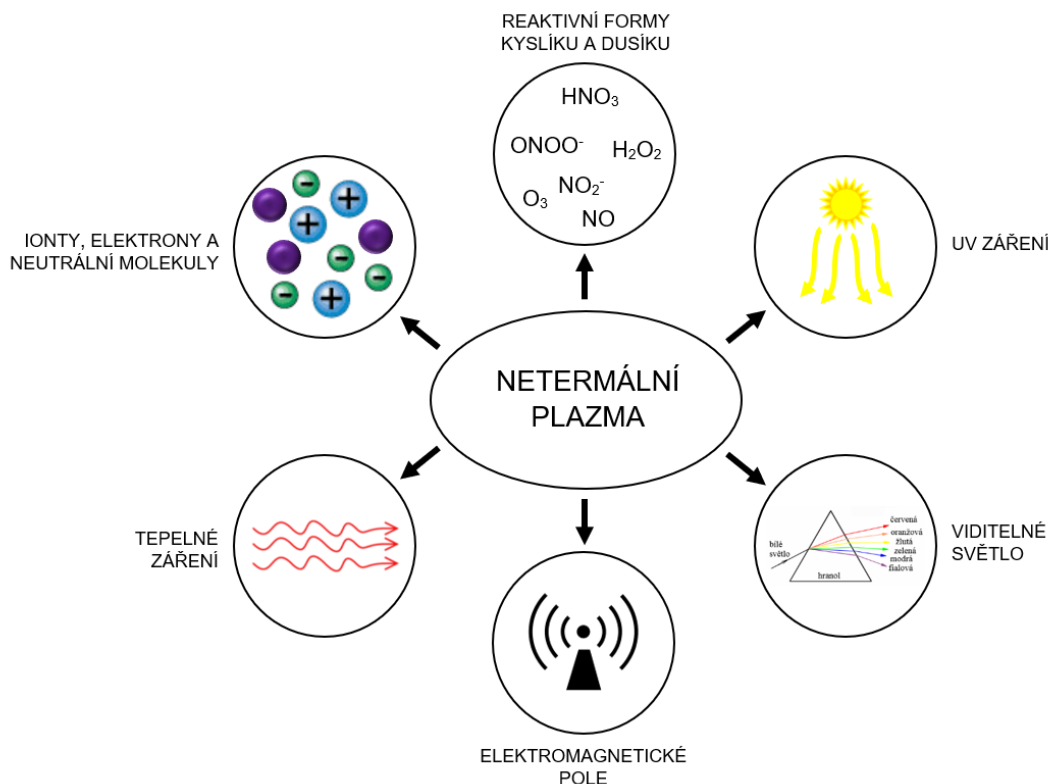
Tabulka 1.1: Klasifikace nízkoteplotního plazmatu.

Mezi další typické znaky NTP patří relativně nízká elektronová hustota  $n_e \approx 10^{10}$  m<sup>-3</sup>, možnost generace plazmatu za atmosférického tlaku a pouze částečná ionizace pracovního plynu, v němž je plazma generováno. Typickými výboji, jež se pro tvorbu netermálního plazmatu

využívají, jsou unipolární/bipolární korónový výboj a různé druhy dielektrických bariérových výbojů [11], více v Kapitole 2.

Jak je vidět na obrázku 1.1 netermální plazma působí na své okolí 6 základními účinky:

- elektromagnetické pole
- UV záření
- tepelné záření
- viditelné světlo
- elektrony, ionty, neutrální atomy/molekuly
- aktivní částice pocházející z atmosféry výboje, speciálně pro vzduchu jsou to reaktivní formy kyslíku (ROS) a dusíku (RNS), souhrnně RONS.



Obrázek 1.1: Účinky netermálního plazmatu za atmosférického tlaku ve vzduchu.

V současné době existuje řada různých aplikací netermálního plazmatu například v oblasti medicíny [1], zemědělství [12], průmyslu [3] aj. V rámci této práce budou blíže představeny principy na jejichž základě je netermální plazma využíváno pro medicínské účely.

Podrobnosti ohledně interakcí jednotlivých složek plazmatu mezi sebou a okolím a jejich využití v medicínských aplikacích bude blíže popsáno v následujících podkapitolách 1.1 a 1.2 a v Kapitole 3.

## 1.1 Srážky v netermálním plazmatu

Základním mechanismem tvorby výboje NTP, jeho fyzikálních vlastností a chemického složení jsou srážkové procesy (reakce) v pracovním plynu, ve kterém je plazma generováno [13]. V této části kapitoly bude kladen důraz především na popsání vybraných klíčových srážkových procesů a reakcí, jež mají na fyzikální a chemické vlastnosti plazmatu zásadní vliv. Dále pak budou stručně uvedeny a vysvětleny reakce vedoucí k tvorbě reaktivních forem kyslíku a dusíku (RONS), jež patří mezi hlavní strůjce baktericidních účinků NTP [6], jež budou více rozebrány v Kapitole 3.

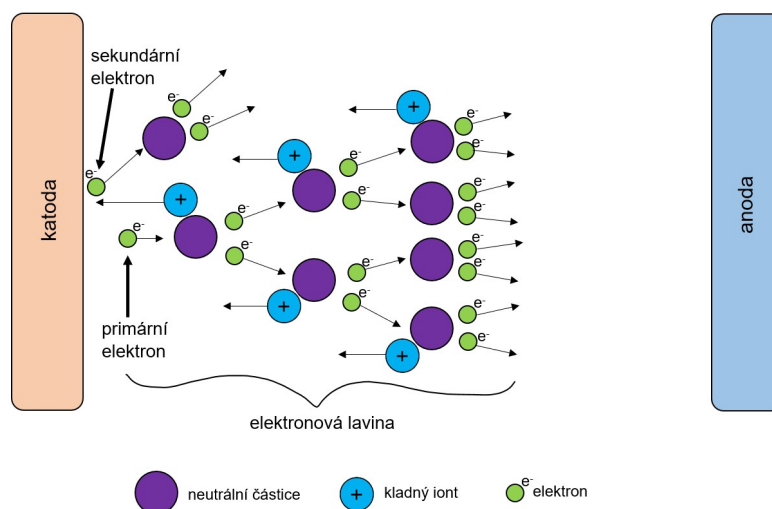
Srážkové procesy v plazmatu lze rozdělit do dvou základních skupin podle vlivu, který mají na charakteristiku výboje NTP [13]. První skupinou jsou srážky ovlivňující fyzikální vlastnosti plazmatu, které jsou zároveň důležitými činiteli při tvorbě samotného výboje. Do této skupiny se řadí například srážková ionizace, záchyt elektronu, disociace molekuly, excitace, fotodisociace nebo rekombinace. Druhou skupinou jsou pak srážkové procesy, též nazývané reakcemi, jež významně ovlivňují chemické složení plazmatu, avšak na tvorbu výboje a fyzikálních vlastností zásadní vliv nemají. Mezi důležité typy reakcí pak patří sloučení, substituce, disociace a přenos náboje.

Nejprve budou podrobněji rozebrány srážkové procesy ovlivňující tvorbu výboje a fyzikální vlastnosti NTP.

### 1.1.1 Townsendova teorie elektronových lavin

Základním principem, který vede ke vzniku samostatného výboje a tedy i k tvorbě netermálního plazmatu, je tzv. Townsendova teorie elektronových lavin [14].

Elektronová lavina (viz. obrázek 1.2 níže) je jev, při kterém je mezi dvěma elektrodami elektrickou silou urychlován elektron po celé své střední volné dráze. Tento elektron se následně nepružně srazí s neutrální částicí a je-li jeho kinetická energie dostatečně vysoká, danou částici ionizuje, tedy vyrazí z jejího elektronového obalu další elektron. Nově vzniklý elektron a původní elektron jsou dále urychlovány elektrickým polem a naráží (nepružně) do dalších dvou neutrálních částic, jež opět ionizují, což vede ke vzniku dalších dvou volných elektronů. Takto proces pokračuje až do doby, kdy nově vzniklé kladně nabitě ionty nevygenerují dostatečně vysoké pole, které kompenzuje elektrické pole mezi elektrodami. Díky tomu se již elektrony dostatečně neurychlují a nedochází tak k dalšímu ionizování neutrálních částic a tvorbě nových elektronů, v důsledku čehož dojde k ustálení počtu volných elektronů mezi elektrodami.



Obrázek 1.2: Schématické zobrazení elektronové laviny.

Anglický fyzik John Sealy Townsend v rámci své teorie elektronových lavin stanovil podmínku 1.3 pro existenci samostatného výboje v plynu mezi dvěma elektrodami. Podmínka byla zformulována na základě zavedení prvního a druhého Townsendova koeficientu.

První Townsendův koeficient  $\alpha$ , tj. koeficient objemové ionizace, charakterizuje počet volných elektronů  $n_1$ , viz. vztah 1.1, které vznikly na základě spuštění elektronové laviny prvním volným elektronem.

$$n_1 = n_0(e^{\alpha d}), \quad (1.1)$$

kde  $n_0$  je počáteční množství volných elektronů a  $d$  je vzdálenost mezi elektrodami.

Druhý Townsendův koeficient  $\gamma$ , tj. koeficient emise, určuje s jakou účinností jsou z katody emitovány sekundární elektrony po nepružném nárazu kladných iontů vyprodukovaných během primární elektronové laviny. Množství elektronů druhé generace  $n_2$  je pak dáno vztahem 1.2.

$$n_2 = n_0(e^{\alpha d} - 1)\gamma. \quad (1.2)$$

Townsendova podmínka pro existenci samostatného výboje má tedy tvar:

$$n_0(e^{\alpha d} - 1)\gamma \geq n_0 \Rightarrow (e^{\alpha d} - 1)\gamma \geq 1. \quad (1.3)$$

Je-li tato podmínka 1.3 splněna, začne se mezi elektrodami formovat samostatný výboj a generuje se tak netermální plazma. Pokud ke splnění Townsendovy podmínky nedojde, tvorba nových elektronů a iontů se zpomalí až výboj nakonec vyhasne.

### 1.1.2 Srážky elektronů s částicemi

Srážky elektronů s neutrálními, excitovanými či ionizovanými částicemi se též označují jako elementární procesy v plazmatu [13], neboť výsledné produkty těchto srážek hrají zásadní roli ve formování výboje a následném chování a fyzikálních vlastnostech netermálního plazmatu.

Důležité je také zmínit, že pro netermální plazma a jeho vlastnosti jsou významné především nepružné srážky, při kterých se zachovává pouze celková hybnost srážky, nikoliv však kinetická energie [15]. Protože právě tyto srážky netermální plazma formují.

Nyní bude popsáno 5 nejčastějších srážkových procesů elektronů s částicemi, jež výrazně ovlivňují vlastnosti NTP a jsou důležité pro tvorbu RONS.

Tvary obecných rovnic srážek pro jednotlivé typy srážek jsou zaznamenány v tabulce 1.2 na konci této části.

#### Ionizace

Srážková ionizace [15] je vůbec nejdůležitějším srážkovým procesem v plazmatu. Ve formě elektronových lavin se podílí na vzniku samostatného výboje a je také nedílnou součástí tvorby RONS.

Nalétávající elektron ionizuje neutrální částici (atom/ molekulu) v případě, že během nepružné srážky předá částici dostatek energie na vyrazení jednoho elektronu z valenční vrstvy jejího elektronového obalu. Tato energie se označuje jako ionizační energie (potenciál) dané neutrální částice a musí být větší nebo rovna vazebné energii elektronu, který má být z valenční vrstvy neutrální částice vyražen.

#### Excitace

Excitace [15] je proces, při kterém elektron vázaný v atomu/molekule přejde z nižší energetické hladiny do vyšší na základě dodání excitační energie zvenčí. Excitační energie je rovna rozdílu energií obou energetických hladin.

K excitaci neutrální částice může dojít při nepružné srážce s elektronem, kdy velikost kinetické energie, jež nalétávající elektron částici předal, je alespoň rovna excitační energii daného vázaného elektronu v částici.

### **Záchyt elektronu**

Záchyt elektronu [15] je srážkový proces, jehož výsledkem je tvorba záporných iontů neboli anionů. Důležitým produktem tohoto typu srážek jsou například volné záporné iontové radikály kyslíku ( $O^-$ ) nebo hydroxylový anion ( $OH^-$ ).

K záchytu elektronu neutrální částicí může dojít v případě, srazí-li se elektron nepružně s atomem/molekulou s vysokou elektronegativitou, schopnost částice snadněji vázat elektrony. Výsledkem této srážky je vznik záporného iontu, přičemž může a nemusí, v závislosti na velikosti kinetické energie, dojít k jeho excitaci.

Během tohoto procesu dochází k uvolnění energie, tzv. elektronové afinity. Tato energie je mnohonásobně menší než energie ionizační, a proto v netermálním plazmatu může docházet k zániku anionů během tepelných srážek s ostatními těžkými částicemi.

### **Disociace molekuly**

Nepružná srážka elektronu s neutrální molekulou může vést k její disociaci [15], tj. rozpadu na dvě neutrální, excitované či ionizované molekuly (atomy). Tento proces je velmi důležitý z hlediska produkce RONS, nicméně k disociaci molekuly je zapotřebí velkého množství energie, a proto k ní nedochází tak často jako k ostatním srážkovým procesům.

### **Rekombinace**

Při nepružné srážce volného elektronu s kladně nabitým iontem může dojít k tzv. rekombinaci elektronu, neboli zakomponování elektronu zpět do elektronového obalu kationu a uvolnění přebytečné energie [16]. Tato energie se označuje jako rekombinační a může být vyzařena ve formě fotonu, odvedena ve formě tepelné energie nebo být použita k disociaci kladně nabitého iontu.

Speciálním případem tohoto typu srážek je disociativní elektron-iontová rekombinace, při které dochází ke spojení volného elektronu s kladným molekulárním iontem za vzniku dvou nových neutrálních molekul/atomů. Během této srážky je přebytečná rekombinační energie využita pro disociaci původní molekuly na dvě nové částice, jež v závislosti na velikosti rekombinační energie mohou a nemusí být excitované. Tato srážka je nejrychlejším typem rekombinace elektronu v molekulárních plynech v objemu NTP.

#### **1.1.3 Srážky fotonů s částicemi**

Srážky fotonů s částicemi se obdobně jako srážky elektronů s částicemi řadí mezi elementární procesy v NTP. Při nepružné srážce fotonu s neutrální, popřípadě excitovanou částicí může dojít k absorbování jeho kinetické energie, která se přemění na vnitřní energii částice.

Mechanismy jednotlivých srážek jsou velmi podobné srážkám elektronu a částice.

### **Fotodisociace**

Fotodisociace je nejdůležitějším srážkovým procesem ze skupiny srážek mezi fotony a neutrálními molekulami.



Průběh fotodisociace je v podstatě stejný jako u elektronové disociace molekuly, jen elektron je nahrazen fotonem. Obecně může mít fotodisociace jeden z následujících průběhů:



SRÁŽKOVÝ PROCES	OBECNÁ ROVNICE SRÁŽKY
Excitace	$X + e^- \rightarrow X^* + e^-$
Ionizace	$X + e^- \rightarrow X^+ + e^- + e^-$
Záchyt elektronu	$X + e^- \rightarrow X^-$ ,
Disociace molekuly	$AB + e^- \rightarrow A + B + e^-$ , $AB + e^- \rightarrow A^* + B + e^-$ , $AB + e^- \rightarrow A^+ + B + e^- + e^-$
Disociativní elektron-iontová rekombinace	$AB^+ + e^- \rightarrow A + B$ , $AB^+ + e^- \rightarrow A^* + B$

Tabulka 1.2: Srážkové procesy v netermálním plazmatu: srážky elektronu s částicemi, kde  $X$  je neutrální částice v základním stavu, symbol  $*$  značí neutrální částici v jedenkrát excitovaném stavu, symbol  $^+$ , resp.  $^-$  představuje kladný, resp. záporný iont,  $e^-$  značí elektron a  $AB$  je neutrální molekula složená z neutrální částice  $A$  a neutrální částice  $B$ .

#### 1.1.4 Srážky ovlivňující chemické složení plazmatu

Těžké částice v netermálním plazmatu, jak již bylo řečeno v úvodu kapitoly, mají velmi malou kinetickou energii, a proto jejich vzájemné srážky nemají zásadní vliv na fyzikální vlastnosti ani tvorbu plazmatu. V případě nepružné srážky dvou těžkých částic však oproti elementárním procesům dochází k chemickým změnám uvnitř NTP. Z tohoto důvodu jsou tyto srážkové procesy označovány jako chemické reakce [16].

Nyní budou popsány 4 nejdůležitější typy chemických reakcí, jež se podílejí na tvorbě RONS.

Tvary obecných rovnic srážek pro jednotlivé typy srážek jsou zaznamenány v tabulce 1.3 na konci této části.

## Sloučení

Sloučení je chemická reakce při níž dochází ke srážce dvou neutrálních částic za vzniku nové neutrální molekuly. Během této reakce se uvolňuje energie, která novou sloučeninu excituje. Aby se zabránilo následné deexcitaci a rozpadu nové sloučeniny, je typicky po celou dobu reakce přítomna třetí částice, jež slouží k odvedení přebytečné energie, která ji následně excituje.

Příkladem tohoto typu reakcí jsou oxidačně-redukční reakce.

## Substituce

Během substituce dochází k reakci neutrální popřípadě excitované či ionizované částice s neutrální molekulou za vzniku nové molekuly a uvolnění jiné částice [13].

## Disociace

Disociace [13] je nejdůležitějším typem reakce z řady reakcí mezi neutrální a excitovanou částicí. Neutrální molekula je excitovanou částicí disociována buď na dvě neutrální popřípadě excitované částice nebo na jednu ionizovanou a jednu neutrální částici za vzniku volného elektronu.

## Přenos náboje

K přenosu náboje [13] může docházet při reakci kladného iontu s neutrální částicí nebo v případě reakce mezi záporným iontem a neutrální částicí. Přenos záporného náboje je typickou reakcí zejména v netermálním plazmatu v němž je přítomen elektronegativní plyn, např.: kyslík ( $O_2$ ).

SRÁŽKOVÝ PROCES (REAKCE)	OBEČNÁ ROVNICE REAKCE
Sloučení	$X + Y + M \rightarrow XY + M$
Substituce	$A + BC \rightarrow AB + C$
Disociace	$X^* + AB \rightarrow X + A^{(*)} + B^{(*)},$ $X^* + AB \rightarrow X + A^+ + B + e^-$
Přenos náboje	$A^- + B \rightarrow A + B^-,$ $A^+ + B \rightarrow A + B^+$

Tabulka 1.3: Srážkové procesy v netermálním plazmatu: reakce dvou částic, kde  $X$  je neutrální částice v základním stavu, symbol  $*$  značí neutrální částici v jedenkrát excitovaném stavu, symbol  $^+$ , resp.  $^-$  představuje kladný, resp. záporný iont,  $e^-$  značí elektron a  $AB$  je neutrální molekula složená z neutrální částice  $A$  a neutrální částice  $B$ .

### 1.1.5 Tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku

Tvorba RONS je esenciální především pro baktericidní vlastnosti netermálního plazmatu (více viz. Kapitola 3) a je přímo závislá na volbě pracovního plynu.

Jak už vyplývá z názvu, RONS vznikají jako produkty chemických reakcí pokud je v reakci přítomen kyslík ( $O_2$ ) a/nebo dusík ( $N_2$ ). Na základě této podmínky je možné vyrábět RONS v NTP dvěma způsoby [17]. Prvním způsobem je tvorba RONS v rámci plazmového výboje za přítomnosti kyslíku ( $O_2$ ), dusíku ( $N_2$ ) nebo jejich směsi. Takto generované RONS se nazývají primárními a jsou přítomny už v samotném výboji NTP. Druhým způsobem je tvorba RONS při kontaktu plazmového výboje s čistým kyslíkem ( $O_2$ ), dusíkem ( $N_2$ ) nebo jejich směsí. Tyto RONS se nazývají sekundárními a jsou přítomny až v plasma afterglow (dopadový kužel částic, jež se šíří od konce plazmového výboje [18]).

Pro generaci primárních RONS se nejčastěji používá jako pracovní plyn čistý kyslík ( $O_2$ ), dusík ( $N_2$ ), vzduch a nebo vzácné plyny, především argon (Ar) a helium (He), obohacené o příměsi kyslíku ( $O_2$ ), popřípadě dusíku ( $N_2$ ). Množství vyprodukovaných RONS je závislé na množství kyslíku ( $O_2$ ) a dusíku ( $N_2$ ) v pracovním plynu.

Generace sekundárních RONS probíhá nejčastěji při interakci plazmového výboje s okolním vzduchem. Jako pracovní plyn je zde možné použít čisté vzácné plyny (argon, helium...) nebo plyny obohacené o příměsi kyslíku ( $O_2$ ) a dusíku ( $N_2$ ) obdobně jako při generaci primárních RONS. V závislosti na pracovním plynu se budou generovat buďto pouze sekundární RONS a primární aktivní částice podle druhu pracovního plynu, například argonové kationy ( $Ar^+$ ). Nebo primární i sekundární RONS, bude-li v pracovním plynu přítomen kyslík ( $O_2$ ), dusík ( $N_2$ ) nebo jejich směs.

Při použití vzduchu pro výrobu primárních, popřípadě sekundárních RONS hraje velkou roli i vzdušná vlhkost, neboli množství vody ( $H_2O$ ) přítomné ve vzduchu. Mezi reaktivní formy kyslíku se řadí i vysoce reaktivní hydroxylové radikály ( $OH^\cdot$ ), hydroxylové aniony ( $OH^-$ ), peroxidové radikály ( $HO_2^\cdot$ ), peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) a další [17], jež ke své výrobě potřebují přítomnost vodíku ( $H_2$ ) popřípadě vody ( $H_2O$ ), jak bude uvedeno v tabulce 1.4 níže. Tyto reaktivní formy kyslíku jsou brány za jedny z hlavních strůjců baktericidních účinků NTP [6].

V tabulce 1.4 níže jsou ukázány některé základní a nejčastější srážkové a reakční procesy, jež vedou ke vzniku primárních a sekundárních RONS v netermálním plazmatu, jehož pracovními plyny jsou vzduch, argon, popřípadě směsi obohacené o kyslík ( $O_2$ ) a dusík ( $N_2$ ).

Příklady konkrétních RONS důležitých pro baktericidní účinky netermálního plazmatu budou uvedeny a blíže popsány v Kapitole 3 zabývající se interakcí NTP s bakteriální buňkou.

## 1.2 Využití netermálního plazmatu pro medicínské účely

Studium netermálního plazmatu pro jeho potenciální medicínské aplikace je jedním z nejmladších odvětví plazmové vědy, nazývaným též plazmová medicína [1]. V současné době patří mezi nejvíce zkoumané medicínské aplikace NTP hojení chronických ran a kožní infekce; ošetřování tkáně dutiny ústní a kanálků zubních kořenů; modulace srážlivosti krve a léčba rakoviny [3].

První pokusy zkoumající netermální plazma z biomedicínského hlediska začaly už v polovině devadesátých let minulého století [1]. Z počátku byly zkoumány především možné baktericidní účinky dielektrického bariérového výboje v interakci s povrchy a kapalinami, více viz. Kapitola 2 a 3. Brzy následovaly první experimenty s dezinfekcí ran, zvyšováním proliferace (novotvoření) fibroblastů (základní buňky vazivové tkáně schopné vytvářet všechny typy mezibuněčné hmoty) a oddělování buněk.

V roce 2005 pak relativně malý obor plazmové medicíny zaznamenal první větší nárůst zájmu ze strany plazmových fyziků zabývajících se nízkoteplotním plazmatem a od té doby zájem vědecké i medicínské obce a veřejnosti neustále roste [1]. Tento nárůst zájmu vyústil v roce 2010 ve zřízení prvních

SRÁŽKY ELEKTRONU S ČÁSTICEMI	
Ionizace	$e^- + N_2 \rightarrow N_2^+ + e^- + e^-,$ $e^- + O_2 \rightarrow O_2^+ + e^- + e^-,$
Záchyt elektronu	$e^- + O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-}$
Disociace molekuly	$e^- + H_2O \rightarrow OH^- + H\cdot,$ $e^- + O_2 \rightarrow {}^1O_2 + e^-,$ $e^- + O_2 \rightarrow O + O + e^-,$ $e^- + H_2O \rightarrow OH\cdot + H\cdot + e^-,$ $e^- + N_2 \rightarrow N + N + e^-$
SRÁŽKY FOTONU S ČÁSTICEMI	
Fotoionizace	$O_2 + h\nu \rightarrow O^* + O^*,$ $H_2O + h\nu \rightarrow H^* + OH^*$
SRÁŽKY OVLIVŇUJÍCÍ CHEMICKÉ SLOŽENÍ PLAZMATU	
Sloučení	$O + O_2 + M \rightarrow O_3 + M(N_2, O_2),$ $OH\cdot + OH\cdot + M \rightarrow H_2O_2 + M(N_2, O_2),$ $H\cdot + O_2 + N_2 \rightarrow HO_2\cdot + N_2$
Substituce	$N + OH\cdot \rightarrow NO + H\cdot,$ $NO + O_3 \rightarrow NO_2 + O_2$
Disociace	$Ar^* + O_2 \rightarrow Ar + O + O$

Tabulka 1.4: Tvorba reaktivních forem kyslíku a dusíku: atomární kyslík ( $O$ ), singletový kyslík ( ${}^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ), superoxidový aniont ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxylové radikály ( $OH\cdot$ ), hydroxylové anionty ( $OH^-$ ), peroxidové radikály ( $HO_2\cdot$ ), peroxid vodíku, atomární dusík ( $N$ ), oxid dusnatý ( $NO$ ), oxid dusičitý ( $NO_2$ ) ( $H_2O_2$ ), symbol \* značí excitovaný stav atomu/molekuly, symbol + značí jedenkrát ionizovaný stav atomu/molekuly a  $M$  představuje doprovodnou částici jež přejímá přebytečnou energii z reakce [19].

klinických testů a v roce 2013 byla prvním dvěma plazmatickým aplikátorům PlasmaDerm a kINPen MED viz. obrázek 1.3, vyvinutým v Německu, udělena certifikace CE [2]. Tato certifikace označuje daný produkt za zdravotnické zařízení a umožňuje jeho volné uvedení na trh v rámci EU. Rok 2013 tedy byl pro obor plazmové medicíny zlomový, neboť umožnil už přímé nasazení plazmových přístrojů k dennímu užívání v rámci lékařských zákroků.



(a) kINPen MED

(b) PlasmaDerm

Obrázek 1.3: První dva NTP aplikátory s CE certifikací [2].

V následujících letech se zaměření plazmové medicíny začalo pomalu rozšiřovat o další možné aplikace netermálního plazmatu zejména pak o potenciální uplatnění při léčbě rakoviny, což mělo v roce 2019 za následek zřízení prvních klinických studií se zaměřením na léčbu rakoviny v USA [1].

Různá uplatnění netermálního plazmatu v medicíně by se dala rozdělit do čtyř základních skupin: dermatologie, stomatologie, chirurgické zákroky a léčba rakoviny. Výzkumy zkoumající jednotlivé způsoby využití NTP v jednotlivých okruzích medicíny jsou každý v jiném stádiu vývoje od předběžných *in vitro* experimentů, přes *in vivo* experimenty až po klinické studie a konkrétní uplatnění v praxi. Přestože nárůst experimentálního zkoumání a vývoje nových plazmových přístrojů je stále větší, zatím nelze mluvit o stoprocentní integraci plazmové medicíny mezi ostatní medicínské obory v praxi běžně využívané [4].

Hlavní překážkou pro začlenění plazmových aplikátorů mezi ostatní nástroje medicíny je velká komplexnost jednotlivých procesů odehrávajících se při interakci NTP s ošetřovanými oblastmi [20], kdy většina mechanismů účinků NTP ještě není podrobně prozkoumána a popsána a u mnohých z nich tak není známa přesná příčina a možné důsledky jejich působení. Jak bude podrobněji popsáno v Kapitole 3 jedná se o velice komplikované bio-chemicko-fyzikální procesy, jež dosud nebyly důkladně zmapovány. I toto je důvod proč stále probíhá velké množství *in vitro* experimentů zkoumající různé typy plazmových přístrojů a jejich interakci jak s prokaryotními tak eukaryotními buňkami.

Na základě vývoje většího množství potenciálních plazmových aplikátorů však vyvstaly otázky ohledně bezpečnosti jejich používání při ošetřování lidských tkání. V odpověď na tyto obavy proběhlo již několik výzkumů [1], [3] a všechny zatím potvrzují naprostou bezpečnost metod spojených s využitím netermálního plazmatu. Zároveň se vznikem několika již certifikovaných plazmových aplikátorů využívaných v lékařství vyvstávají otázky na možné nežádoucí účinky spojené s dlouhodobým užíváním těchto přístrojů a je tak potřeba zaměřovat studie i na zkoumání pacientů v dlouhodobém horizontu po ošetření netermálním plazmatem [2].

Nyní budou blíže popsána možná uplatnění NTP v různých okruzích medicíny.

Mezi odvětví, na které je v současné době kladen asi největší důraz v rámci vývoje a testování plazmových aplikátorů, patří bezpochyby dermatologie [3], [4], [2]. Při léčbě chronických ran a různých

typů kožních onemocnění jako jsou například bércové vředy, dermatitida, ekzém atd. plazmové aplikátory využívají vlastností netermálního plazmatu, které i v malém množství mohou působit zhoubně na prokaryotní buňky (bakterie, sinice). Tato vlastnost NTP tedy umožňuje dezinfikovat lidskou pokožku a zároveň napomáhat jejímu hojení. V případě ošetřování chronických ran je netermální plazma schopné ránu důkladně vyčistit, aniž by poškodilo zdravou tkáň. Různé výzkumy [3] navíc ukázaly prokazatelné urychlení a změnu mechanismů hojení u ran ošetřovaných netermálním plazmatem. Velkou výhodou léčby kožních onemocnění pomocí netermálního plazmatu je také jeho bezpečné, bezkontaktní a bezbolestné použití.

Další slibné výsledky ukazují výzkumy a klinické studie zabírající se aplikací netermálního plazmatu ve stomatologii [3], [4], [21]. V rámci tohoto medicínského odvětví nachází své největší uplatnění fokusované aplikátory netermálního plazmatu, jako jsou plazmové trysky a plazmové jehly (viz. sekce 2.3). Mezi zákroky, které mohou potenciálně využívat aplikátorů NTP patří: čištění a dezinfekce tkáně ústní dutiny nebo kanálků zubních kořenů; modifikace povrchů zubních implantátů; zlepšení adhezních vlastností při aplikaci zubních implantátů či preventivní ošetření zubů pro zabránění tvorbě zubního kazu. Velkou výhodou při provádění těchto zákroků je fakt, že nedochází k nežádoucímu ovlivňování složení materiálů zubního povrchu ani jeho struktury [3].

Z hlediska chirurgie je velmi důležitou vlastností netermálního plazmatu jeho schopnost ovlivňovat koagulaci (srážlivost) krve [20], jež může zabránit nežádoucím ztrátám krve při operativních zákrocích.

V několika posledních letech se také začíná zkoumat netermální plazma z hlediska jeho možného využití při léčbě rakoviny [20],[3], [4]. *In vitro* experimenty ukazují schopnost netermálního plazmatu vyvolat apoptózu (programovatelnou buněčnou smrt) u určitých typů rakovinných buněk, např.: glioblastomy, buňky rakoviny žaludku, vaječnicků atd. Během *in vivo* experimentů na myších bylo prokazatelně pozorováno zmenšení nádoru po aplikaci netermálního plazmatu. Všechny tyto výsledky jsou však pouze předběžné a je zapotřebí ještě rozsáhlého výzkumu a klinických studií, které doktorům a vědcům umožní lépe pochopit jednotlivé mechanismy vedoucí k potenciálnímu využití netermálního plazmatu jako doprovodné metody pro léčbu rakoviny, například v kombinaci s chemoterapií nebo radioterapií. V souvislosti s léčbou rakoviny se uvažují dva odlišné způsoby využití netermálního plazmatu. Prvním je přímá aplikace plazmatu na nádorové léze druhým pak užití plazmatem aktivovaných roztoků (PAS) jako nový typ chemoterapie, z důvodu jejich snadnější aplikace do ošetřovaných oblastí, více viz. [22].

Kromě výše zmíněných oblastí, existuje celá řada dalších zkoumaných potenciálních aplikací NTP v medicíně, například preventivní ošetřování endotracheálních tubusů (tubusy používané pro zajištění průchodnosti dýchacích cest) [21] nebo inhalace netermálního plazmatu za účelem snížení krevního tlaku a zvýšení koncentrace oxidu dusnatého (NO) v aortě břišní (zkoumáno na krysách) [20].

## Kapitola 2

# Zdroje netermálního plazmatu

V této kapitole bude blíže popsána problematika různých typů zdrojů netermálního plazmatu z hlediska fyzikálního a inženýrského. Hlavní důraz bude kladen na popsání plazmové trysky a plazmových aplikátorů na bázi korónového výboje, neboť právě plazmatické přístroje těchto typů jsou předmětem experimentálního zkoumání této práce.

Zdroje netermálního plazmatu operující za atmosférického tlaku lze obecně rozdělit do tří základních kategorií podle způsobu uspořádání elektrod, mezi kterými je plazma generováno, vůči ošetřovanému vzorku. Tyto tři kategorie jsou: přímé, nepřímé a hybridní zdroje NTP [23]. Zároveň je u jednotlivých plazmatických aplikátorů důležité rozlišovat dva základní způsoby ošetření/sterilizace a to kontaktní a bezkontaktní [18].

V případě kontaktního způsobu ošetření je daný vzorek umístěn přímo do plazmatu, popřípadě je ošetřován v těsném kontaktu s koncem plazmového výboje. Naproti tomu v rámci bezkontaktního ošetřování plazmatem je vzorek od konce plazmového výboje vzdálen a přichází tak do kontaktu pouze se zbytkovým tepelným a UV zářením a reaktivními částicemi, jež jsou součástí tzv. plasma afterglow, dopadového kužele částic, jež se šíří od konce plazmového výboje.

Přímé zdroje plazmatu se vyznačují použitím ošetřované oblasti jako protielektrody a plazma je tak generováno mezi elektrodou, která je součástí přístroje a samotnou ošetřovanou oblastí. U tohoto typu zdrojů tedy dochází pouze ke kontaktnímu způsobu sterilizace plazmatem. K nejrozšířenějším druhům přímých zdrojů plazmatu patří tzv. objemový bariérový výboj (VDBD), který je speciální konfigurací dielektrického bariérového výboje (DBD), a jež bude blíže popsán v následující části 2.1, [24].

Mezi hlavní výhody přímých zdrojů plazmatu patří zejména umístění ošetřované oblasti přímo do plazmatu, což má za následek vystavení této oblasti nejvyšší možné koncentraci reaktivních částic (RONS), tepelného a UV záření a elektrického a magnetického pole, jež vede k vyšší účinnosti a kratším časům ošetření. Tento způsob ošetřování je výhodný zejména pro různé typy povrchů a anorganické materiály, jež nejsou termolabilní [24]. Avšak nemusí být výhodou v případě interakce NTP s lidskou pokožkou/tkání, kdy může, například vlivem silnějšího elektrického pole a vyšší teploty, dojít k popálení pokožky. Tento jev je samozřejmě u léčby jakýchkoliv onemocnění velmi nežádoucí a je proto důležité omezovat velikost proudu ve výboji kapacitou konfigurace elektrod, čímž lze dosáhnout bezbolestného způsobu ošetření [10].

Hlavní nevýhodou aplikátorů s přímými zdroji plazmatu je požadavek na dodržování konstantní vzdálenosti mezi elektrodou a protielektrodou (ošetřovanou oblastí), aby se zamezilo nestabilním výkyvům výboje generující plazma. A proto je výhodné používat tyto typy aplikátorů pouze pro ošetřování rovných ploch libovolné velikosti [9].

Nepřímé zdroje plazmatu v sobě mají, oproti přímým zdrojům, zabudované dvě a více elektrod a plazma je tedy tvořeno přímo uvnitř přístroje. Do oblastí, která je plazmatem ošetřována, je plazma ná-

sledně transportováno pracovním plynem nebo difúzí. Toto uspořádání umožňuje využívat jak kontaktní tak bezkontaktní způsob ošetření [9]. Mezi plazmové aplikátory využívající nepřímé zdroje NTP patří různé druhy plazmových trysek (plasma jet), plazmových jehel (plasma needle), plazmových pochodní (plasma torch) apod. [25]. Jednotlivé typy nepřímých zdrojů netermálního plazmatu a aplikátorů, jež je využívají, budou blíže popsány v následujících sekcích kapitoly 2.2 a 2.3.

Díky velkému množství různých typů přístrojů, fungujících na principu nepřímého zdroje plazmatu, je zde na rozdíl od přímých zdrojů možnost velké variability mezi velikostmi ošetřovaných oblastí, uspořádáním elektrod, volbou pracovního plynu, zdroje napětí a dalších parametrů [25].

Oproti přímým zdrojům plazmatu je u aplikátorů využívajících nekontaktní způsob ošetření mnohem nižší koncentrace reaktivních částic, což může mít za následek prodloužení časů ošetření a tedy nižší účinnost než například přístroje používající dielektrický bariérový výboj jako přímý zdroj NTP [23].

Nejnovějším přístupem k výrobě plazmatických aplikátorů je využívání tzv. hybridních zdrojů NTP, které v sobě spojují výhody přímých a nepřímých zdrojů netermálního plazmatu. V současné době je kladen největší důraz na rozvoj a zkoumání SMD (surface mount device) elektrod, více viz. [23].

V následující části budou blíže rozebrány dva hlavní typy výbojů, které lze k tvorbě netermálního plazmatu za atmosférického tlaku použít: dielektrický bariérový výboj a korónový výboj včetně jejich možných implementací při sestavování plazmatických aplikátorů. Hlavní důraz bude kladen, jak již bylo zmíněno výše, především na záporný korónový výboj jako zdroj NTP a plazmovou trysku jako typ plazmatického přístroje, jež jsou předmětem experimentálního zkoumání této práce.

## 2.1 Dielektrický bariérový výboj

Jedním ze způsobů, jak generovat netermální plazma, je tzv. dielektrický bariérový výboj, zkráceně DBD (dielectric barrier discharge). Tento typ výboje má využití jak při přímých, tak i při nepřímých aplikacích plazmatu. Obecně je DBD generováno mezi dvěma a více elektrodami z nichž alespoň jedna musí být pokryta dielektrikem, které limituje velikost procházejícího elektrického proudu a zabraňuje tak zakřívování výboje [23].

Podle způsobu využití a konfigurace elektrod je možné DBD dále rozlišovat na objemový dielektrický bariérový výboj, tj. VDBD (volume dielectric barrier discharge), povrchový dielektrický bariérový výboj neboli SDBD (surface dielectric barrier discharge) a koplanární dielektrický bariérový výboj [10].

Objemový dielektrický bariérový výboj (VDBD) se řadí mezi přímé zdroje plazmatu využívající pouze kontaktní způsob ošetření. Ošetřovaná oblast tedy slouží jako protielektroda a výboj je generován mezi elektrodou přístroje a ošetřovanou oblastí, která je tak vystavena přímému kontaktu s plazmatem, jak je vidět na obrázku 2.1 níže.

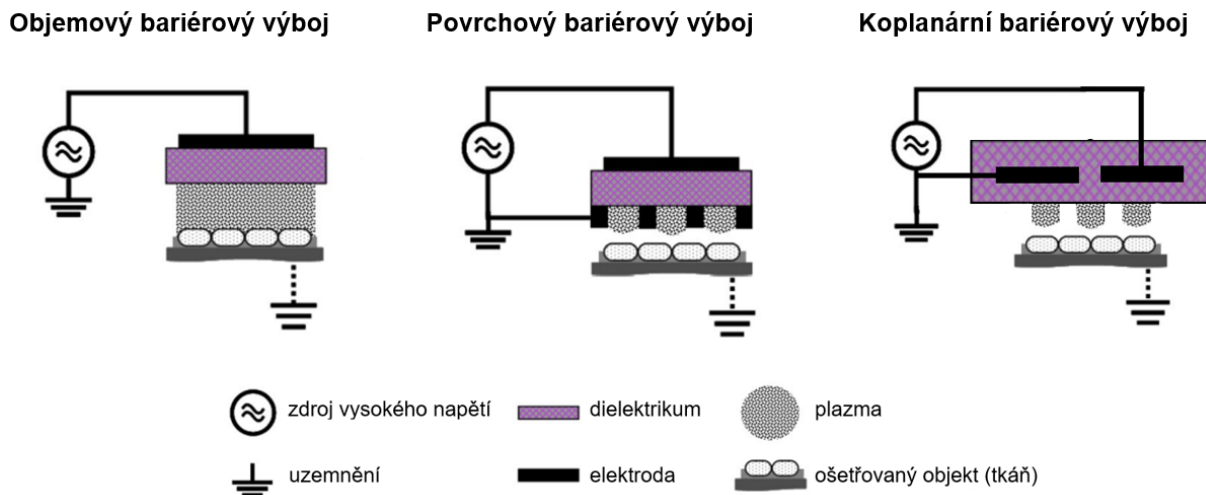
Konfigurace VDBD bývá též označována jako konfigurace plovoucí elektrody [23], neboť při ošetřování povrchu objemovým bariérovým výbojem je možné s přístrojem po povrchu, nebo s povrchem samotným, pohybovat a tak neustále měnit protielektrodu, kterou je samotný ošetřovaný povrch. Jedním z příkladů tohoto způsobu využití VDBD je ošetřování lidské pokožky, jak je také vidět na obrázku 2.2.

Mezi nepřímé zdroje plazmatu pracující s dielektrickým bariérovým výbojem se řadí povrchový a koplanární bariérový výboj. V případě obou těchto uskupení je plazma generováno na povrchu dielektrika a lze tak využít jak kontaktního tak bezkontaktního způsobu ošetření [11].

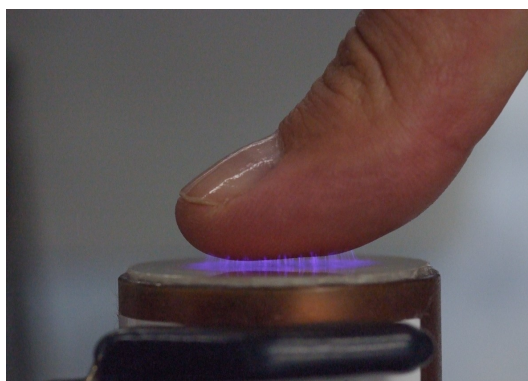
Na obrázku 2.1 jsou ukázány možné konfigurace elektrod pro povrchový a koplanární bariérový výboj. Základní rozdíl mezi těmito dvěma druhy nepřímých zdrojů je v postavení elektrod a dielektrika vůči sobě. V případě povrchového bariérového výboje je dielektrikum umístěno mezi dvě elektrody. Naproti tomu u koplanárního uskupení jsou elektrody umístěny v dielektriku paralelně vedle sebe. Toto uskupení má navíc ještě jednu výhodu. Jsou-li do dielektrika umístěny střídavě uzemněné a vysokonapětíové



elektrody, je tak možné vytvořit ve své podstatě nekonečně velkou plochu plazmatu, kterou je možné následně využít při ošetřování velkých rovných ploch [10].



Obrázek 2.1: Základní konfigurace dielektrického bariérového výboje [10].



Obrázek 2.2: Uskupení plovoucí elektrody s dielektrickým bariérovým výbojem [26]

## 2.2 Korónový výboj

Dalším způsobem jak generovat netermální plazma za atmosférického tlaku je tzv. korónový výboj. Korónový výboj obecně vzniká na ostré hraně elektrody, umístěné v pracovním plynu (vzduch, argon, helium...). Na hraně této elektrody je generováno velmi silné elektrické pole vlivem malého poloměru křivosti, jež při překročení tzv. počátečního napětí vede ke vzniku samostatného výboje. Počáteční napětí je hodnota, při jejímž překročení začíná výboj samostatně hořet a nové částice vznikají prostřednictvím srážkové ionizace [11].

Tento typ výboje, který je charakterizován výtrysky drobných svítících paprsků, což je zpravidla doprovázeno charakteristickým praskáním, je možné pozorovat například na sloupech vysokého napětí, popřípadě na hranách střech, či hromosvodů před bouřkou ve formě tzv. Eliášova ohně [27], jak je vidět obrázku 2.3 níže.



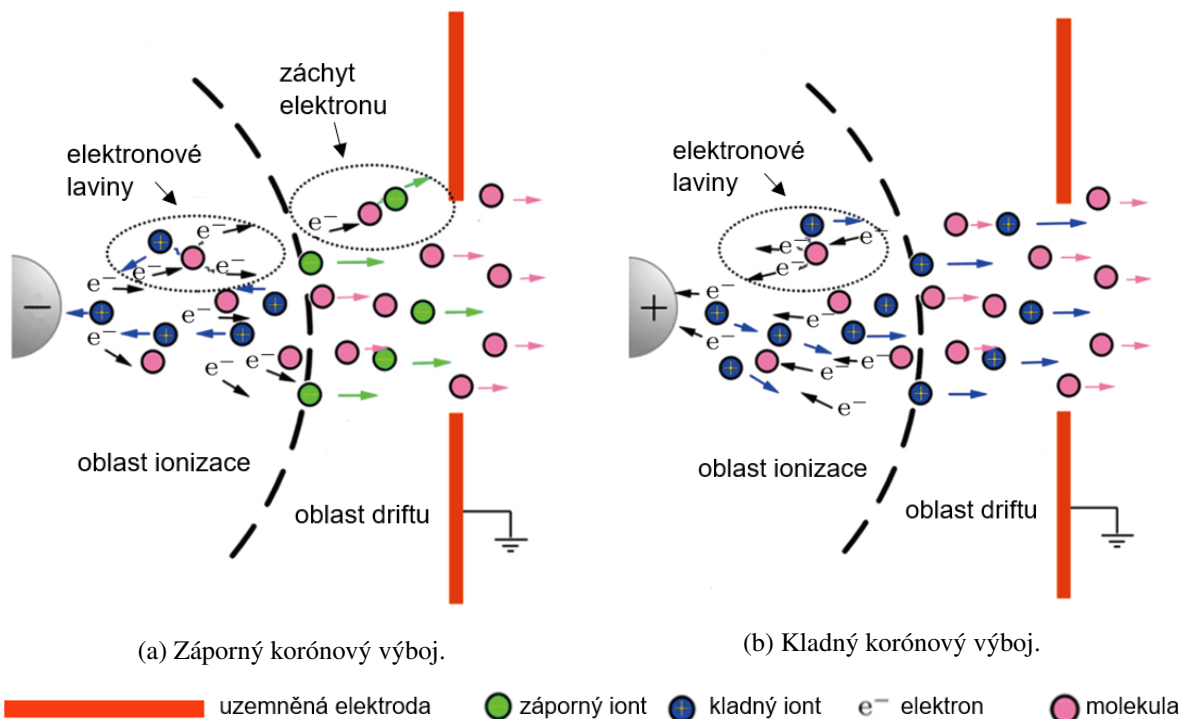
(a) Korónový výboj na věžích katedrály [28].



(b) Korónový výboj na přenosovém vedení [29].

Obrázek 2.3: Příklady Eliášova ohně.

Podle polarity elektrod jsou rozlišovány dva základní druhy korónového výboje: kladný korónový výboj a záporný korónový výboj [11], jak je vidět na obrázku 2.4.



Obrázek 2.4: Schématické zobrazení korónového výboje [30].

Jak je z obrázku 2.4a patrné, záporný korónový výboj vzniká na ostré hraně záporně nabitě elektrody, ze které jsou do okolního prostoru emitovány elektrony. Tyto elektrony jsou následně urychlovány silným elektrickým polem směrem k uzemněné elektrodě. V těsné blízkosti katody dochází vlivem elektronových lavin k velkému množství ionizačních procesů, tj. srážek elektronů s molekulami elektronegativního plynu (plyn jehož atomy/molekuly snadno přijímají volné elektrony například kyslík (O<sub>2</sub>)). S rostoucí vzdáleností od záporné elektrody elektrické pole slabne, elektrony zpomalují a při srážkách s molekula-

lami pracovního plynu dochází k záchytu elektronů za vzniku záporných iontů, které jsou přitahovány k uzemněné elektrodě. Tato oblast zpomalených elektronů je nazývána oblastí driftu, ve které elektrické pole řídí drift elektronů, dokud se nedostanou až k uzemněné elektrodě, popř. nejsou zachyceny molekulou a nevytvoří tak záporně nabitý iont [30].

Přesunem těchto iontů a elektronů podél elektrického pole směrem k uzemněné elektrodě vzniká tzv. iontový vítr [30]. V případě záporného korónového výboje je tento vítr relativně pomalý s velkou aktivní oblastí.

Kladný korónový výboj, viz obrázek 2.4b, vzniká na ostré hraně kladně nabitých elektrod. Elektrony, jež jsou na povrchu anody generovány fotoemisí, jsou v oblasti ionizace, stejně jako v případě záporného korónového výboje, urychlovány elektrickým polem a vznikají tak opět elektronové laviny, které ionizují neutrální molekuly v pracovním plynu. Oproti záporné koróně jsou však elektrony, jež dosáhnou hranice ionizační oblasti přitahovány zpět ke katodě a iontový vítr je tak tvořen kladnými ionty, které se driftem přesouvají směrem k uzemněné elektrodě a molekulami, jimž kladné ionty při srážce předávají část své energie [30].

Oproti zápornému korónovému výboji je iontový vítr kladné koróny mnohem rychlejší, ale v důsledku přitahování elektronů zpět k anodě, je jeho aktivní oblast velice malá a soustředí se převážně kolem středové osy výboje [30].

Speciálním případem korónového výboje je tzv. bipolární korónový výboj, jenž dohromady spojuje jak záporný, tak kladný korónový výboj díky konfiguraci dvou opačně nabitých elektrod proti sobě [31]. Na katodě se tak generuje záporná koróna a zároveň na anodě vzniká kladná koróna a reaktivní částice z obou výbojů jsou přitahovány k protilehlým elektrodám, čímž se zvyšuje množství srážek a tím pádem i koncentrace reaktivních částic, jež v rámci tohoto výboje vznikají.

### 2.2.1 Plazmové aplikátory

Plazmové aplikátory využívající jako zdroj plazmatu korónový výboj se řadí mezi nepřímé zdroje NTP, kdy reaktivní částice, vznikající při interakci výboje s pracovním plynem, následně difundují ven z plazmatu. Tyto difundující částice vytvářejí shluk pohybujících se částic kuželovitého tvaru, nazývaný se plasma afterglow [18], který následně působí na oblast, jež je plazmatem ošetřována. Podobně jako v případě přístrojů s DBD lze i aplikátory s korónovým výbojem využívat ke kontaktnímu i bezkontaktnímu ošetření [32].

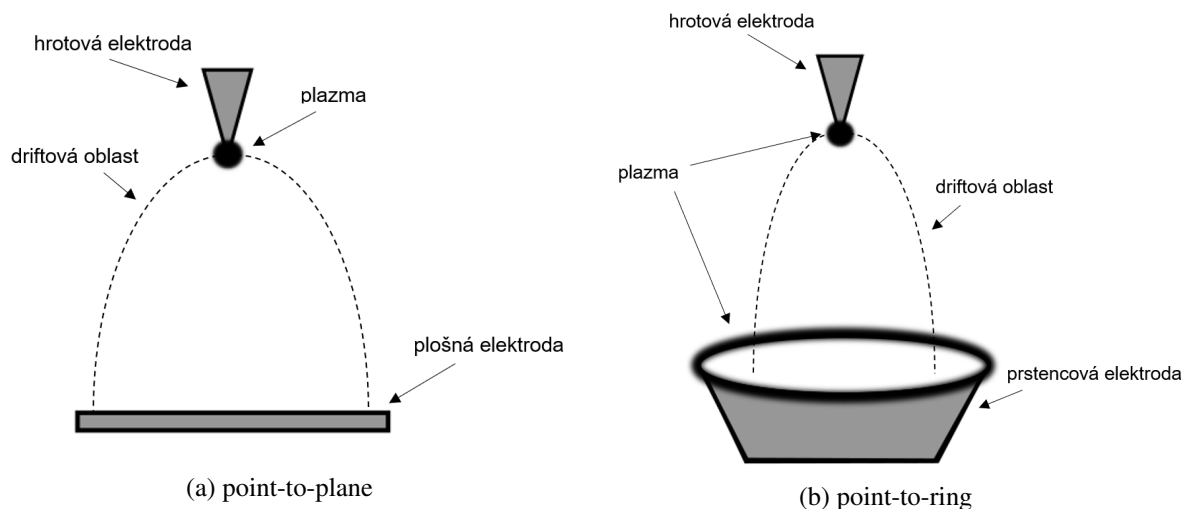
Aplikátory NTP pracující na bázi korónového výboje lze rozdělit do tří základních skupin podle typu výboje, jímž je plazma generováno, na: aplikátory se záporným korónovým výbojem, kladným korónovým výbojem a bipolárním korónovým výbojem.

Nejčastěji používaným uspořádáním elektrod v případě plazmových aplikátorů se záporným/kladným korónovým výbojem je tzv. point-to-plane konfigurace [11]. Jak je patrné z obrázku 2.5a, toto uspořádání sestává z jedné hrotové záporně/kladně nabitých elektrod a jedné ploché uzemněné elektrody.

Obdobu této konfigurace je používána i v případě aplikátorů s bipolárním korónovým výbojem, kdy může být plochá uzemněná elektroda vyměněna například za prstencovou elektrodu či destičku s prohlubní uprostřed [33], viz. obrázek 2.5b.

## 2.3 Plazmová tryska

Plazmovou trysku, tj. plazma jet, lze podobně jako povrchový dielektrický bariérový výboj využívat v podobě přímého i nepřímého zdroje NTP, jak ke kontaktnímu, tak i bezkontaktnímu ošetřování vybraných objektů [23]. V současné době patří plazmové trysky mezi komerčně nejrozšířenější zdroje



Obrázek 2.5: Schématické zobrazení konfigurace elektrod pro generaci korónového výboje.

netermálního plazmatu a to nejen v oblastech medicínského využití, ale také v oblasti úpravy a ošetřování povrchů.

Vývoj plazmových trysek započal již koncem padesátých let minulého století [34]. Zpočátku se však veškeré výzkumy soustředily pouze na vývoj plazmových trysek s lokálně termálně stabilním plazmatem tj. termálním plazmatem, jehož teplota přesahovala 10 000 K, za účelem prozkoumat možnosti plazmových pohonů. Až na přelomu dvacátého a dvacátého prvního století začali vědci přicházet s myšlenkou plazmových trysek fungujících na bázi netermálního plazmatu o teplotě v rozsahu 300 až 1000 K.

Za posledních dvacet let byl kladen velký důraz na zkoumání a vývoj plazmových trysek s netermálním plazmatem, které by bylo možné využít v medicínských aplikacích. Posledním trendem v této oblasti je pak miniaturizace samotných plazmových trysek, jež má umožnit snadnější manipulaci a případný převoz přístrojů.

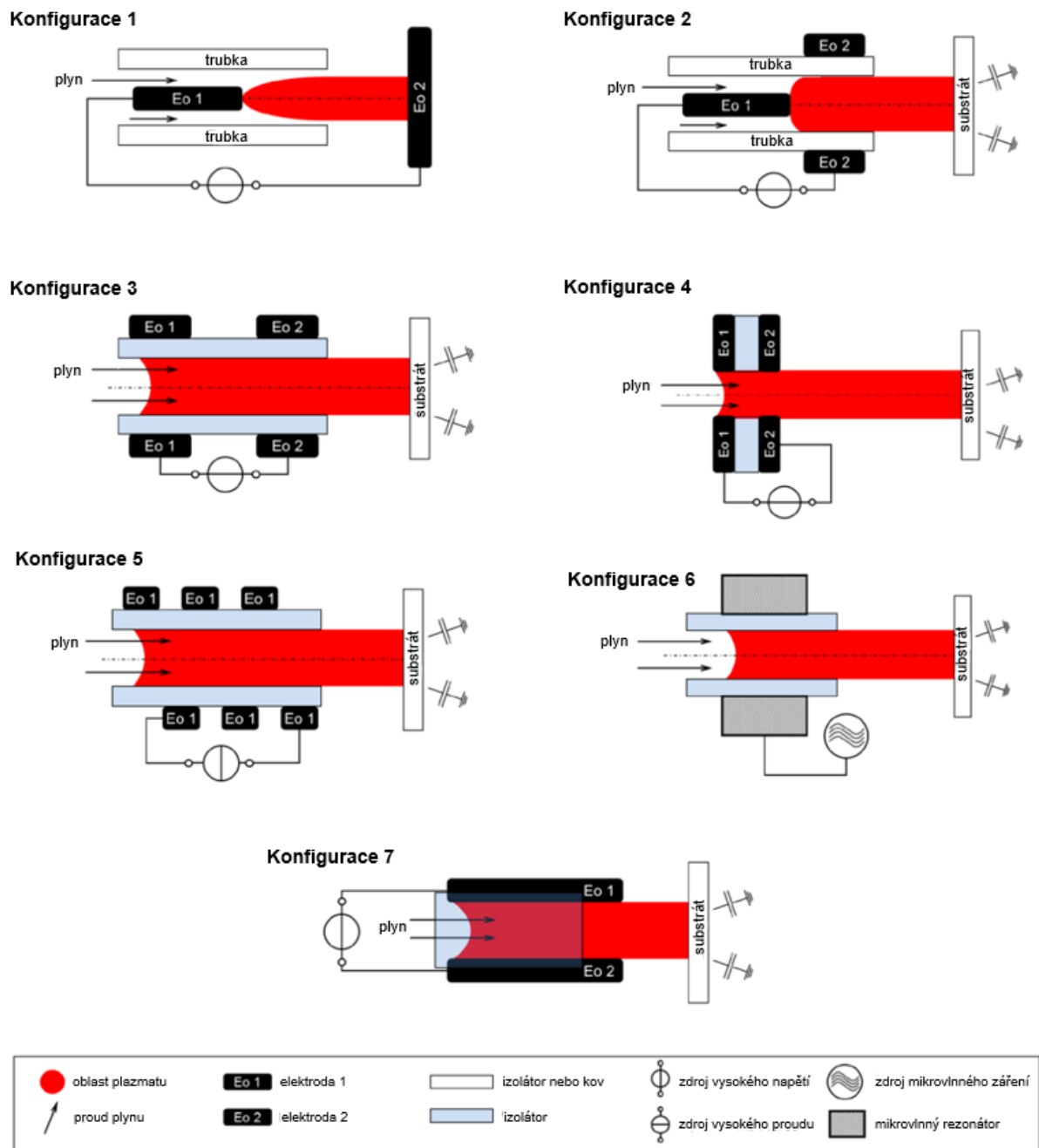
Díky posledním deseti letům intenzivního rozvoje netermálních plazmových trysek došlo k velkému rozrůznění jejich charakteristik a inženýrského zpracování. Lu, Laroussi a Puech (2012) [25] proto přišli se základním přehledem a klasifikací známých typů plazmových trysek, které rozdělili do čtyř hlavních skupin podle způsobu, jakým je NTP v plazmové trysce generováno, na: trysky elektrodové bez dielektrika, trysky s dielektrickým bariérovým výbojem (DBD), trysky s výbojem podobným DBD a jedno elektrodové trysky.

Kromě typů výbojů jejichž pomocí je plazma generováno, je možné plazmové trysky dělit i podle napájecích zdrojů na: trysky se zdrojem střídavého proudu, trysky se zdrojem stejnosměrného proudu, trysky s radio-frekvenčním zdrojem a trysky s mikrovlnným zdrojem plazmatu [34].

Každá z těchto skupin se liší nejen typem výboje, který používá, ale také uspořádáním elektrod a ostatních částí uvnitř plazmové trysky. Společným znakem všech plazmových trysek je pak jejich základní konfigurace. Každá plazmová tryska obsahuje plynovou trysku a jednu, dvě nebo více elektrod, mezi kterými je plazma generováno. Odtud je pak pomocí pracovního plynu plazma transportováno až k objektu (oblasti), jež je ošetřován. Způsobů, jakými lze uspořádat elektrody uvnitř plazmové trysky, je hned několik. Sedm nejpoužívanějších konfigurací [34] je schématicky zobrazeno na obrázku 2.6 níže.

Konfigurace 1 na obrázku 2.6 je zástupcem uspořádání elektrod, jenž se využívá pro termální plazmové hořáky s přenášeným obloukem (typ obloukového výboje, kdy je ošetřovaný materiál použit jako protielektroda a výboj je tak generován mezi elektrodou hořáku a ošetřovaným materiálem). Pokud je však

tato konfigurace dostatečně miniaturizovaná a napojena na zdroj stejnosměrného/střídavého proudu nebo rádiových vln, je možné ji použít i pro sestavení netermální plazmové trysky.



Obrázek 2.6: Schématické zobrazení sedmi základních konfigurací plazmových trysek [34].

Plazmové trysky využívající dielektrický bariérový výboj jako generátor plazmatu je pak možné sestavit v Konfiguraci 2 (viz. obrázek 2.6), přidá-li se na elektrodu 1 dielektrická vrstva nebo v Konfiguraci 3 (viz. obrázek 2.6).

Konfigurace 4 z obrázku 2.6 je naproti tomu využívána v přístrojích, které mají jako zdroj plazmatu mikro dutinový katodový výboj (MHCD).

Indukčně vázané plazma je pak zobrazeno v Konfiguraci 5 na obrázku 2.6 a plazma generováno mikrovlnným zářením je schématicky zakresleno jako Konfigurace 6, obrázek 2.6.

Konfigurace 7 z obrázku 2.6 je příkladem  $\mu$  plazmové trysky za atmosférického tlaku, která byla vytvořena na základě návrhů z roku 1998 [34].

Mezi hlavní výhody plazmových trysek patří zejména jejich schopnost fokusace plazmového paprsku, díky níž je možné ošetřovat velmi malé a jinak těžko dostupné oblasti. Proto je například možné využívat plazmové trysky při operačních zákrocích zubařů [10]. Avšak plazmové trysky nemusí být používány pouze na malé oblasti. Při zapojení více trysek do jednoho přístroje je možné výrazně zvětšit ošetřovanou oblast a tento typ zdroje NTP tak použít i k ošetřování větších oblastí. Nicméně prvotně jsou k ošetřování větších oblastí určeny nefokusované přístroje s DBD.

Další výhodou je možnost upravovat složení plazmatu prostřednictvím volby pracovního plynu, nejčastěji argonu, helia, dusíku či obyčejného vzduchu [23].

Největší nevýhodou všech typů plazmových trysek je pak jejich vyšší cena a nutnost průběžného dokupování plynových bomb s pracovním plynem, které na rozdíl od zdrojů s korónovým výbojem popřípadě DBD zabírají výrazně více místa.

## Kapitola 3

# Interakce NTP ve vzduchu s bakteriálními buňkami

V této kapitole bude blíže popsána interakce netermálního plazmatu ve vzduchu s bakteriálními buňkami a její možné baktericidní účinky.

Interakce NTP ve vzduchu s buňkami bakterií je velice komplexní bio-chemicko-fyzikální proces, jehož jednotlivé mechanismy dosud nebyly detailně prozkoumány a popsány [35]. A proto zde budou pouze nastíněny hlavní myšlenky a zmíněny některé konkrétní výzkumy, které se baktericidními účinky netermálního plazmatu zabývají.

Vzhledem k rozličným typům výbojů, jež mohou generovat netermální plazma, a jejich následné implementaci při vývoji různých plazmových aplikátorů, viz. Kapitola 2, je každá jednotlivá interakce NTP s bakteriální buňkou specifická a může se lišit nejen množstvím a druhem vyprodukovaných částic, ale také silou tepelného a UV záření, či množstvím elektrického proudu, které přijde do kontaktu se stěnou buňky [9], je-li ošetřovaný vzorek vložen přímo do plazmového výboje. Průběh této interakce je navíc závislý i na typu vzorku, který je plazmatem ošetřován a to nejen z hlediska druhu bakterie, ale také stádia, ve kterém se bakteriální buňka (kolonie) nachází. Je tedy důležité rozlišovat, zda dochází k ošetřování živých buněk, buněčných spor (vysoce odolné klidové stádium buňky, při němž neprobíhají žádné metabolické procesy [36]) a nebo biofilmů (bakteriální struktura sloužící k jejich vzájemné ochraně, komunikaci a adhezenci [37]).

Právě množství těchto proměnných, jež jednotlivé interakce NTP s bakteriální buňkou ovlivňují, velice komplikuje snahu o porovnání výsledků různých výzkumných skupin mezi sebou. Na základě toho je velmi obtížné přesně a detailně jednotlivé mechanismy účinků NTP popsat.

Jak již bylo zmíněno v Kapitole 1 netermální plazma ve vzduchu působí na své okolí 6 hlavními účinky: RONS; elektrony, ionty a neutrálními molekulami; UV zářením; tepelným zářením; viditelným světlem a elektromagnetickým polem. Z dosavadních výzkumů [6], [35], [38], [24] ovšem vyplývá, že především RONS jsou hlavními aktéry baktericidních účinků netermálního plazmatu ve vzduchu. Právě z tohoto důvodu bude v následující části kladen hlavní důraz na popis interakce plazmatem generovaných RONS s živými bakteriálními buňkami. Závěrem kapitoly pak budou zmíněny možné odchylky, výhody či komplikace této interakce s bakteriálními spory, která je důležitá pro experimentální část této práce.

Jedním z možných způsobů jak na baktericidní mechanismy NTP ve vzduchu nahlížet je dělit je na fyzikální a biologické mechanismy [39].

Fyzikální část interakce se odehrává převážně na povrchu bakteriální buňky při kontaktu se stěnou a cytoplazmatickou membránou. Naproti tomu biologická část interakce probíhá nejen na povrchu, ale také uvnitř bakteriální buňky. Za hlavní strůjce fyzikálních baktericidních mechanismů jsou pak považovány různé druhy nabitých částic a k významnému poškození dochází většinou až po uplynutí del-

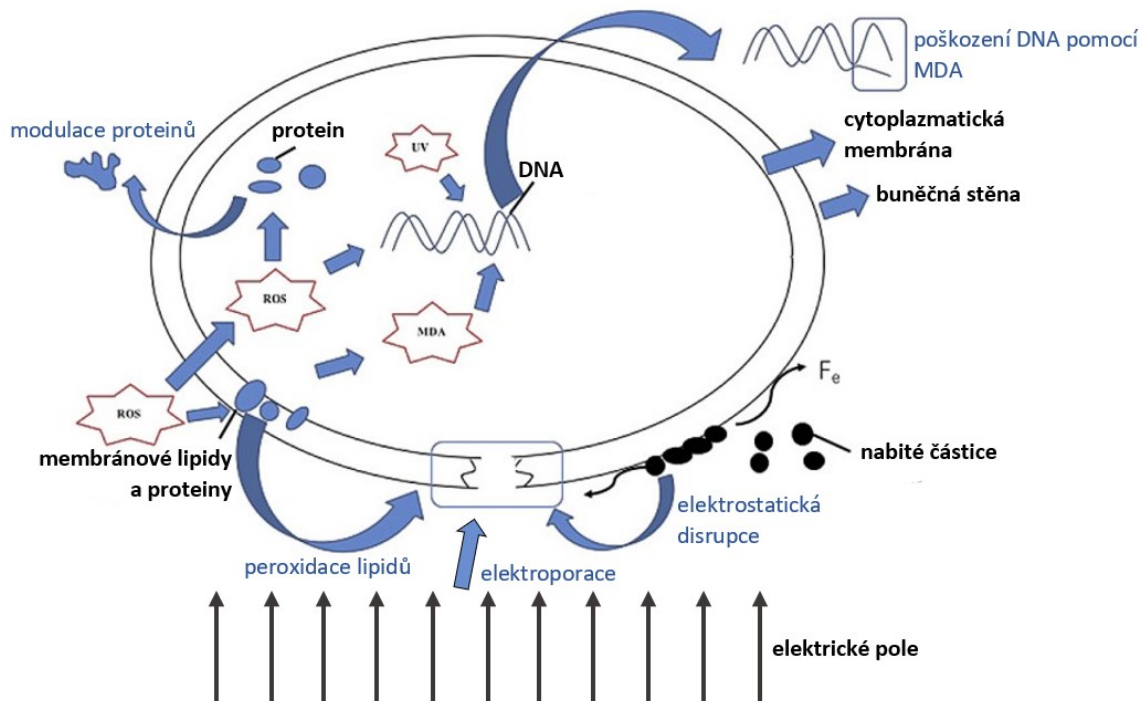
šího časového úseku [35]. Naproti tomu jsou biologické baktericidní mechanismy připisovány zejména reaktivním formám kyslíku a dusíku (RONS), jejichž účinky se mohou projevit již krátce po začátku ošetřování pomocí NTP [6].

Tímto způsobem však na baktericidní účinky NTP ve vzduchu nebylo vždy nahlíženo. Jak ve své práci uvádí Liao a spol. (2016) [6] v počátcích výzkumu netermálního plazmatu bylo za hlavního strůjce baktericidních účinků považováno především UV záření, které je v rámci plazmatu produkováno. UV záření, zejména o vlnové délce v rozsahu 220 - 280 nm (UVC záření), je schopné vyvolat reakci thyminu a cytosinu v DNA, což má za následek značné poškození až úplné zastavení replikačních schopností buňky. Nicméně pozdější výzkumy [40], [39], [41] ukázaly, že ačkoliv je UV záření v plazmatu produkováno, nejedná se o UVC záření, popřípadě ho není produkováno dostatečné množství, aby mělo signifikantní baktericidní účinky. A proto dnes není UV záření bráno za významného původce baktericidních účinků NTP.

Nyní budou blíže představeny hlavní fyzikální mechanismy baktericidních účinků NTP ve vzduchu.

Liao a spol. (2016) [6] ve svém shrnutí uvádí dva hlavní příklady fyzikálních baktericidních mechanismů NTP: elektrostatickou disrupci a elektroporaci, schématicky viz. obrázek 3.1 níže.

Elektrostatická disrupce, jak je vidět na obrázku 3.1, je proces k němuž může dojít při nakumulování příliš velkého množství elektronů a iontů na povrchu buněčné stěny. Tato stěna si na základě vnitřního tlaku v buňce udržuje svůj tvar. Vytvoří-li se (nashromážděním většího počtu nabitých částic) na vnější straně stěny elektrostatický tlak vyšší, než je vnitřní tlak buňky, dojde k jejímu porušení (disrupci). Při disrupci může dojít až k prasknutí buněčné stěny a poškození buněčné membrány, které má za následek únik intracelulárních komponentů, jako je například ATP (adenosintrifosfát). Disrupce tedy přispívá k oslabení buňky a může v kombinaci s jinými mechanismy vést až k buněčné smrti [42].



Obrázek 3.1: Schématické zobrazení biologických a fyzikálních mechanismů baktericidních účinků NTP ve vzduchu [6].



Tento mechanismus je dominantní především u přímých zdrojů NTP, kdy je ošetřovaný vzorek umístěn přímo do plazmatu a funguje jako protelektroda. Nicméně při delších ošetřovacích časech je možné jej pozorovat i při ošetřování nepřímými zdroji plazmatu [35].

Dalším významným fyzikálním mechanismem baktericidních účinků NTP, který je zkoumán, je tzv. elektroporace [6], viz. obrázek 3.1. Elektrické pole, které je generováno mezi elektrodou přístroje a ošetřovaným vzorkem, může (při dostatečně vysoké intenzitě) způsobovat disrupci buněčné membrány a vést k úniku intracelulárních komponentů podobně jako v případě elektrostatické disrupce. Na rozdíl od ní, je však tento proces doménou jen přímých zdrojů plazmatu, neboť při ošetřování nepřímými zdroji NTP se ošetřovaný vzorek nachází v příliš velké vzdálenosti od zdroje elektrického pole. Jeho vliv na bakterie je tak možné považovat za zanedbatelný.

V následující části budou blíže představeny možné biologické mechanismy vedoucí k zastavení buněčné replikace a buněčné smrti spolu s hlavními zástupci RONS, jež jsou považovány za strůjce těchto mechanismů.

Mezi nejdůležitější reaktivní formy dusíku (RNS), z hlediska baktericidnosti, patří excitovaný dusík ( $N^*$ ) a různé oxidy dusíku ( $NO_x$ ), převážně pak oxid dusnatý (NO) a oxid dusičitý ( $NO_2$ ). Oxidy dusíku ( $NO_x$ ) v kombinaci s vodou (vzdušnou vlhkostí) jsou pak důležitými činiteli ovlivňující pH prostředí. Tato vlastnost RNS je velmi dobře uplatnitelná při inhibici bakteriálního růstu a replikaci buněk. Ideální pro růst většiny bakteriálních kultur jsou mírně kyselá prostředí (pH=6), existují však i výjimky rostoucí i při např.: pH=2 [43]. V případě interakce oxidů dusíku ( $NO_x$ ) s vodou kyselost prostředí stoupá a zabraňuje tak další replikaci buněk [24].

Nejdůležitějšími zástupci ROS jsou pak atomární kyslík (O), singletový kyslík ( $^1O_2$ ), ozon ( $O_3$ ), superoxidový anion ( $O_2^-$ ), hydroxylové radikály ( $OH^\cdot$ ), hydroxylové aniony ( $OH^-$ ), peroxidové radikály ( $HO_2^\cdot$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ) [17].

Mezi dosud zmapované a experimentálně podložené biologické mechanismy NTP s baktericidními účinky, jejichž nositeli jsou ROS, patří: chemické změny molekul (např.: peroxidace lipidů) a změny metabolických dějů (např.: vyvolání programované buněčné smrti) [6].

Peroxidace lipidů je proces, při němž dochází k oxidativnímu poškození polynenasycených mastných kyselin lipidů za vzniku hydroperoxidů, a je doménou zejména hydroxylových radikálů ( $OH^\cdot$ ) a peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ) [44].

V případě Gram-negativních bakterií, studováno na živé *E. coli*, byla pozorována peroxidace především u membránových lipidů (lipidy, jež jsou součástí cytoplazmatické membrány), viz. obrázek 3.1. Naproti tomu u Gram-pozitivních bakterií, studováno na živé *S. aureus*, mohou být ROS transportovány rovnou skrz cytoplazmatickou membránu přímo dovnitř buňky, kde způsobují oxidativní stres intracelulárním komponentům [6], jak je vidět na obrázku 3.1.

Peroxidace membránových lipidů může vést k poškození vlastností cytoplazmatické membrány, jako je snížení její tekutosti, narušení její integrity či zvýšení její propustnosti [45]. Tato poškození mají pak za následek nekontrolovatelné proudění reaktivních částic dovnitř buňky, kde mohou následně ničit důležité buněčné struktury jako je DNA, a zároveň způsobují únik cytoplazmy ven z buňky, jak je vidět na obrázku 3.1.

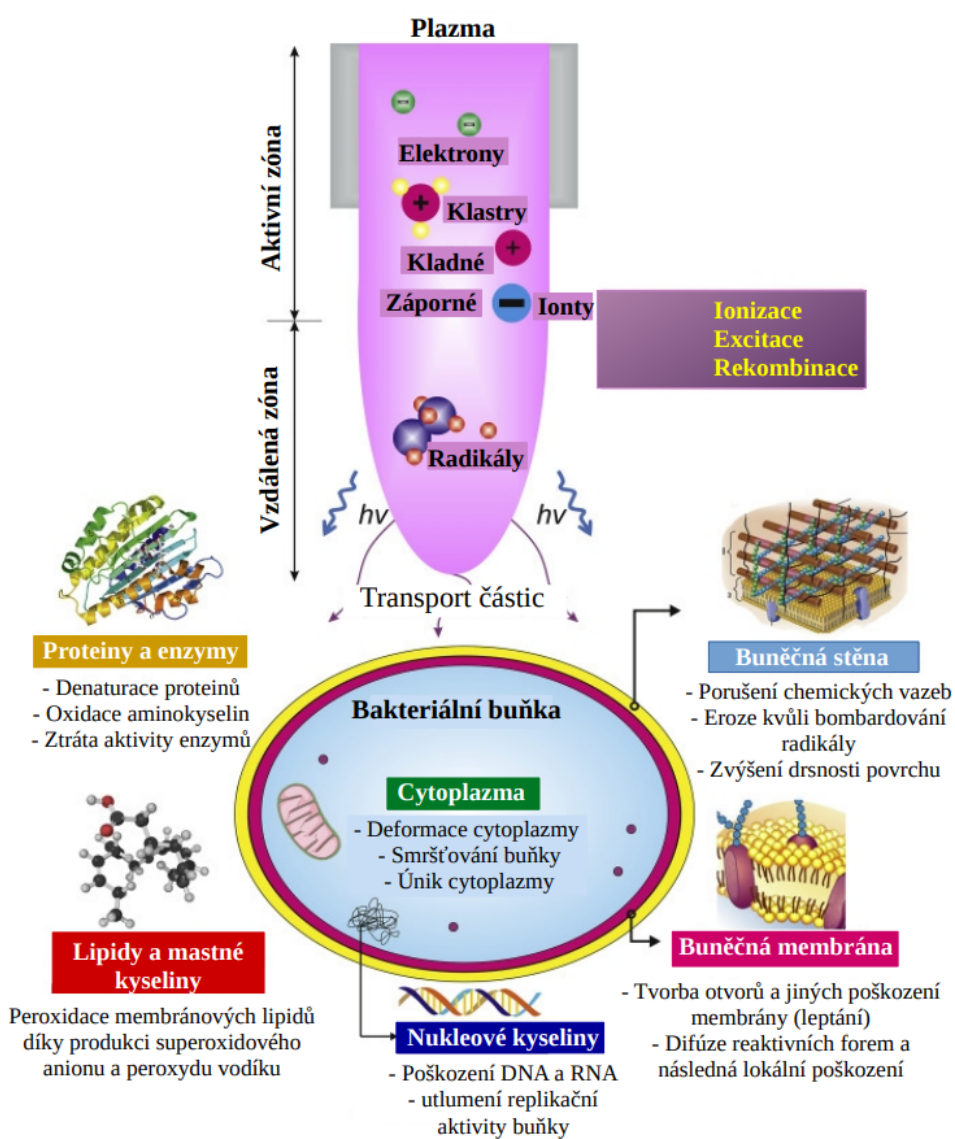
Zároveň je během peroxidace lipidů produkován malondialdehyd (MDA), který slouží jako marker peroxidace lipidů a jež spolu s dalšími produkty této reakce funguje jako sekundární reaktivní sloučenina, která interaguje s DNA a proteiny uvnitř buňky a způsobuje jejich trvalé poškození, viz. obrázek 3.1.

Peroxidace lipidů tedy vede k nevratnému poškození buňky a v případě zasažení DNA i k narušení jejich replikačních schopností [45], čímž bakteriální buňku prokazatelně uvádí do stavu živého ale nekultivovatelného, tj. VBNC (viable but nonculturable), stavu [6].

Další výzkumy [6] ukázaly ještě jinou schopnost hydroxylových radikálů ( $\text{OH}^\cdot$ ) a to provádět chemické změny molekul pomocí modulační proteinů, které jsou součástí buněčné membrány. Konkrétně jde o změnu prostorové struktury proteinů, což může vést k poškození jejich funkčnosti, viz. obrázek 3.1. Avšak k získání bližších informací ohledně tohoto biologického mechanismu, jenž může mít baktericidní účinky, je potřeba provést další výzkumy.

Jak ve svém shrnutí uvádí například Liao a spol. (2017) [6] dalším ze signifikantních biologických mechanismů interakce NTP ve vzduchu s bakteriálními buňkami může být vyvolání tzv. programované buněčné smrti, neboli PCD (programmed cell death). Z výzkumů vyplývá, že při nahromadění většího množství intracelulárních ROS dochází k velkému oxidačnímu stresu buňky, který může vést až k PCD.

Na obrázku 3.2 níže je vidět shrnutí základních mechanismů a schématické zobrazení průběhu interakce NTP s bakteriální buňkou.



Obrázek 3.2: Schématické zobrazení interakce netermálního plazmatu s bakteriální (prokaryotní) buňkou: klastry jsou chemické komplexy obsahující tři a více centrálních atomů, jež jsou vázány vazbou kov-kov [22].

Interakce NTP se sporami bakterií využívá stejných mechanismů, jako v případě interakce se živými buňkami. Rozdíl tedy spočívá pouze v obranné stavbě buňky, která je díky stádiu spory obalena větším množstvím proteinových a dalších vrstev, jež chrání jádro buňky před vnějšími nepříznivými podmínkami. Naproti tomu, díky zastavení veškerých metabolických procesů, je vnitřek buňky až na genetickou informaci (DNA) ve své podstatě prázdný [36].

Z práce Huanga a spol. (2018) [38] vyplývá, že hlavním biologickým mechanismem inaktivujícím bakteriální spory je tzv. leptání ochranných proteinových vrstev z buněčné stěny pomocí ROS. Dále pak přispívá také působení UV záření na DNA buňky a difúze RONS dovnitř buněk, jež má za následek modifikace vnitřních struktur buňky.

Z experimentálního hlediska je největší rozdíl mezi ošetřováním živých bakterií a spor časová délka ošetření. Zatímco některé plazmatické operátory vykazují vysokou baktericidnost živých buněk již během několika vteřin [35], v případě spor se ošetření může pohybovat v řádech minut až hodin [38].

## Kapitola 4

# Experimentální část

V experimentální části studie záporného korónového výboje a plazmové trysky pro medicínské účely byly zkoumány fyzikální a technické parametry obou přístrojů a jejich baktericidní účinky. Na základě těchto charakteristik byly následně oba přístroje srovnány.

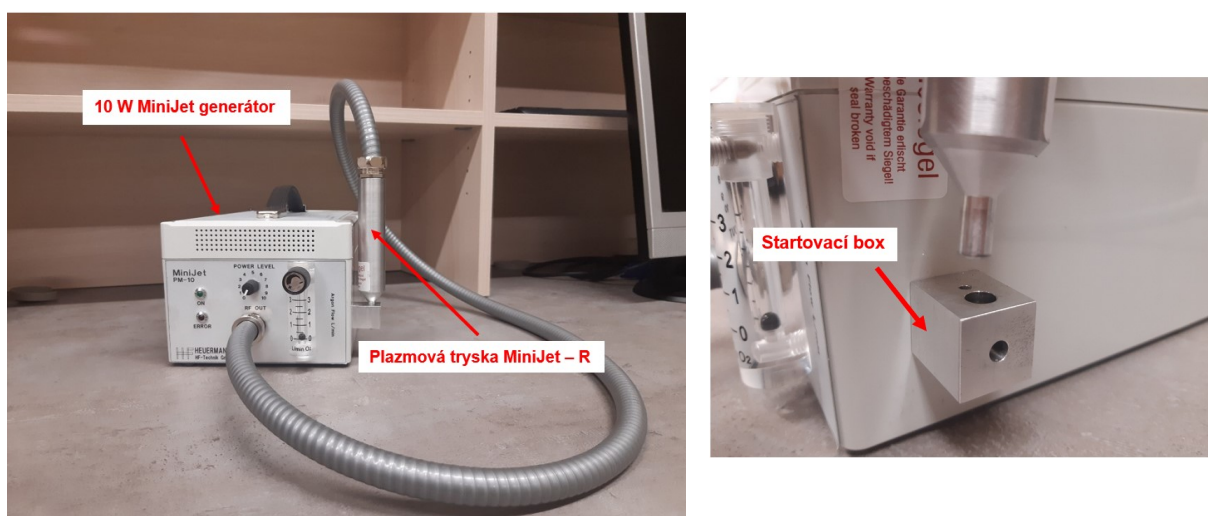
V této kapitole budou nejprve představeny oba zkoumané přístroje a dále popsána metoda, jež byla užita k určení jejich baktericidních účinků.

### 4.1 Parametry použitých plazmatických aplikátorů

Jak již bylo řečeno výše, tato práce se zabývá studiem dvou plazmatických aplikátorů generujících NTP za atmosférického tlaku, konkrétně MiniJetu PM - 10.R a plazmatického aplikátoru využívajícího jako zdroj plazmatu záporný (bipolární) korónový výboj, dále jen PAzk.

MiniJet PM - 10.R je komerční plazmatický aplikátor, který byl navržen a zkonstruován německou firmou Heuermann HF-Technik GmbH za účelem zkoumání a následného použití v rámci aktivování termosenzitivních povrchů, hubení bakterií, dekontaminace atd. [46].

Na obrázku 4.1 vlevo jsou vidět dvě základní části, ze kterých se tento přístroj skládá: 10 W MiniJet generátor a plazmová tryska MiniJet-R.



Obrázek 4.1: MiniJet PM - 10.R: (vlevo) pohled zepředu, (vpravo) detail na plazmovou trysku MiniJet - R.

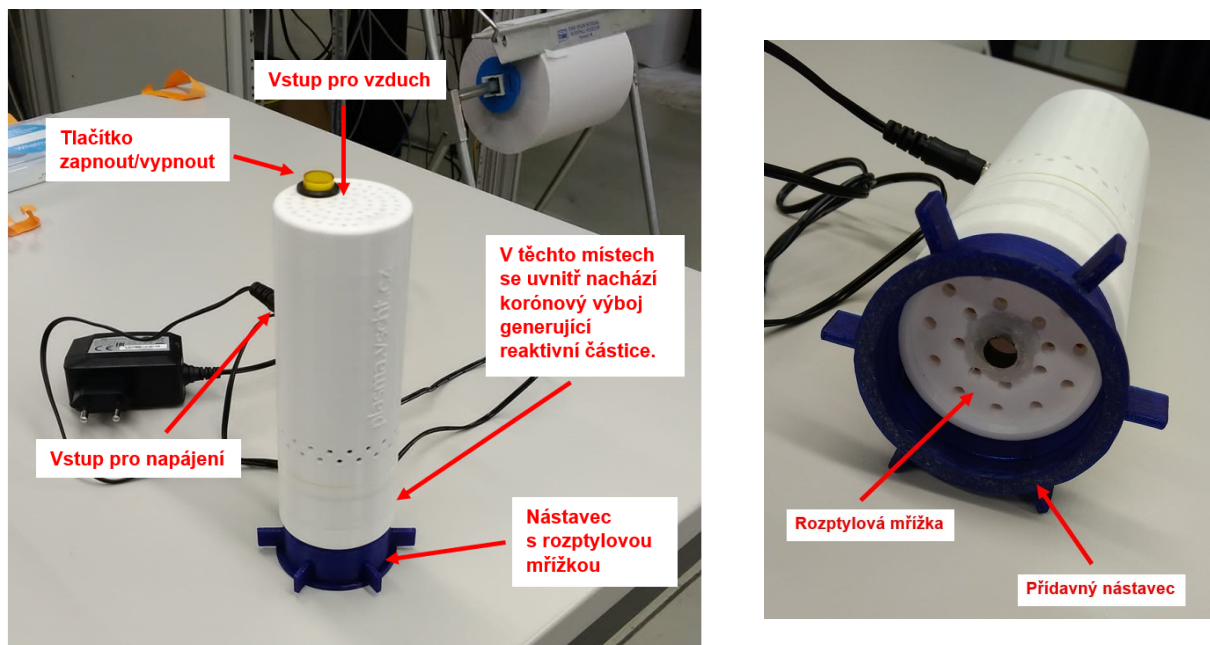
Generátor je zdrojem mikrovlnného záření o frekvenci 2,45 GHz ve frekvenčním pásmu ISM a MiniJet tak spadá do skupiny plazmových trysek, které jako zdroj elektromagnetického pole využívají mikrovlny. Výkon generátoru je nastavitelný v rozsahu 2 - 10 W, jako pracovní plyn využívá argon a má v sobě navíc zabudován průtokoměr s rozsahem 0 - 3 l/min.

Plazmová tryska MiniJet-R je s generátorem spojena krátkou hadicí. Délka samotné plazmové trysky je 155 mm a šířka 33 mm, průměr trysky u výstupu plazmatu je 6 mm.

Vzhledem k tomu, že se jedná o komerčně prodejný přístroj, podrobnosti mechanismů, jež používá ke generaci NTP, nejsou veřejnosti přístupné, a proto nelze přesně určit zda se jedná o plasma jet na bázi dielektrického bariérového výboje nebo korónového výboje. Obecný mechanismus generace plazmatu ovšem známý je. Na konci plazmové trysky je umístěna elektroda. Jakmile je konec plazmové trysky vložen do startovacího boxu, který se nachází na boku generátoru, viz. obrázek 4.1 vpravo, dotkne se elektroda uvnitř trysky drátěného pletiva, jež je v něm instalováno. Je-li připojen zdroj argonu a zapnut generátor mikrovln na maximum (10 W), dojde k zapálení výboje a NTP se začne generovat v podobě úzké trysky plazmatu. Jakmile je plazma zapáleno, je možné plazmovou trysku ze startéru vyjmout a manipulovat s ní podle potřeby.

Mezi další charakteristiky MiniJetu patří vysoký stupeň ionizace díky velikosti provozní frekvence. Dále umožňuje snadné zapálení plazmatu, které nevyžaduje přítomnost vysokého napětí. Poskytuje možnost kontaktního i bezkontaktního ošetření dané oblasti. A v neposlední řadě má kompaktní velikost, která umožňuje snadnou a bezpečnou manipulaci.

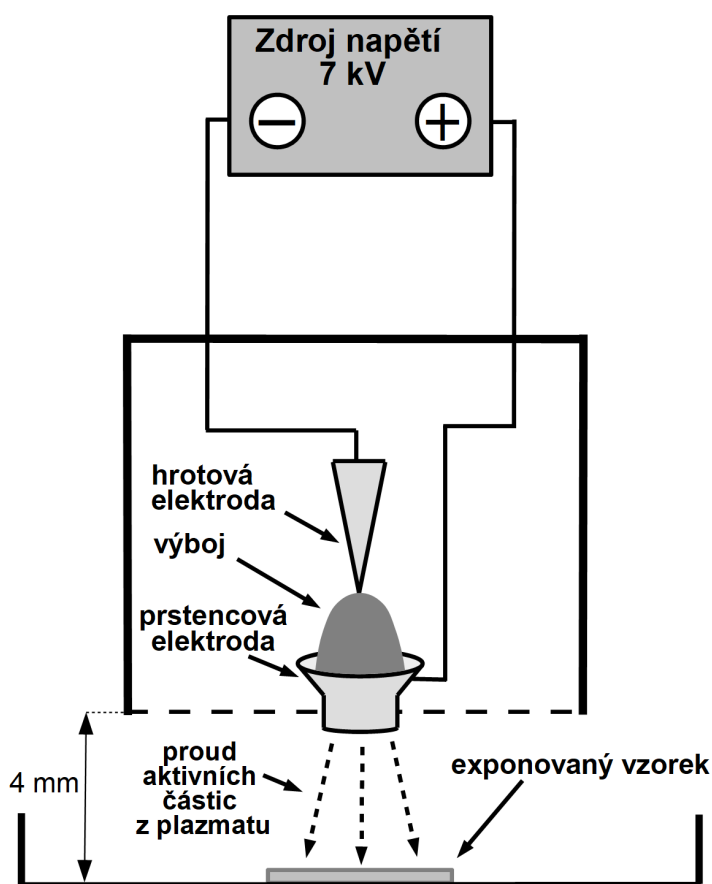
Plazmatický aplikátor PAzk, viz. obrázek 4.2, byl naproti tomu navržen a sestaven na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze panem Ing. Josefem Khunem, Ph.D. a nejedná se tedy o standardizovaný přístroj. Obdobně jako MiniJet je i PAzk určen především k hubení bakterií a dekontaminaci různých typů povrchů.



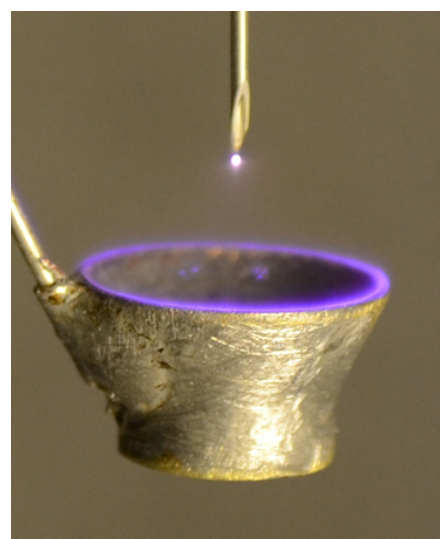
Obrázek 4.2: Plazmatický aplikátor PAzk: (vlevo) pohled z boku, (vpravo) pohled zespoda.

Jak je vidět na obrázcích 4.2 a 4.3a plazmatický aplikátor se sestává ze 5 základních částí: obalu a přídatného nástavce z materiálu PET-G vytištěných na 3D tiskárně; zdroje vysokého stejnosměrného napětí; elektrodového systému point-to-ring (hrot-prsteneček) a rozptylové mřížky.

Z podrobného schématu na obrázku 4.3a je patrné, že PAzk využívá jako zdroj NTP bipolární korónový výboj v konfiguraci elektrod point-to-ring (viz. obrázek 4.3b), kdy hrotová elektroda funguje coby katoda a prstencová elektroda představuje anodu. Přestože se z čistě technického hlediska jedná o bipolární korónový výboj, většina reaktivních částic, jež následně působí na ošetřovanou oblast, je z hlediska uspořádání elektrod (částice z katody proudí směrem k ošetřované oblasti na rozdíl od částic generovaných polem kolem anody) produkována především katodou, a proto je jako zdroj tohoto plazmatického aplikátoru uváděna záporná nikoliv bipolární koróna. Vzdálenost mezi elektrodami je 4,5 mm a jako zdroj napětí je použit stejnosměrný proud v kombinaci s vysokonapěťovým modulem. Hrotová elektroda je tvořena injekční jehlou Medoject 0,6×25 mm (výrobce Chirana T. Injecta), prstencová elektroda pak zužujícím se mosazným prstencem, jehož největší průměr je 11,4 mm.



(a) Schématický nákres plazmatického aplikátoru PAzk.



(b) Fotografie uspořádání elektrod uvnitř plazmatického aplikátoru PAzk i se zapáleným bipolárním korónovým výbojem.

Obrázek 4.3: Plazmatický aplikátor PAzk (schéma i fotografie Ing. Josef Khun, Ph.D.).

Na spodní část aplikátoru PAzk v místě, kde z něj vycházejí reaktivní částice v podobě plasma afterglow, je umístěna rozptylová mřížka (viz. obrázek 4.2 vpravo) o průměru 50 mm. Díky této mřížce je možné rovnoměrně rozptýlit reaktivní částice proudící ven z plazmatu a pokrýt tak větší plochu, než v případě fokusovaného přístroje. Navíc je na spodní konec plazmatického aplikátoru PAzk možné přidělat přidavný nástavec (obr. 4.2 vpravo) a vytvořit z něj tak přístroj pracující v uzavřeném objemu.

Výkon aplikátoru PAzk je 1 W s napětím na elektrodách 7 kV a proudem ve výboji ve výši 150  $\mu\text{A}$ . Jako pracovní plyn používá vzduch o pokojové teplotě.

V tabulce 4.1 níže jsou stručně shrnuty technické a fyzikální parametry obou výše zmíněných přístrojů, jejichž porovnání a evaluace jsou součástí následující Kapitoly 5.

	MiniJet PM - 10.R	plazmový aplikátor PAzk
výrobce	Heuermann HF-Technik GmbH (Německo)	Ing. Josef Khun, Ph.D. (VŠCHT)
zdroj EM pole	mikrovlnné záření	stejnoseměrný proud
výkon [W]	2 - 10	1
pracovní plyn	argon	vzduch
zdroj NTP	neznámý	záporný (bipolární) korónový výboj
konfigurace elektrod	neznámá	hrot-prsteneč
typ ošetření	kontaktní/bezkontaktní	bezkontaktní
fokuse plazmového výboje	ano	volitelná rozptylová mřížka
účel	aktivace termosenzitivních povrchů, hubení bakterií, dekontaminace...	hubení bakterií, dekontaminace velkých povrchů...

Tabulka 4.1: Parametry studovaných plazmatických aplikátorů: MiniJet PM - 10.R [46] a plazmatický aplikátor PAzk.

## 4.2 Referenční protokol

K porovnání baktericidních účinků MiniJetu a plazmatického aplikátoru PAzk byl použit referenční protokol sestavený v roce 2015 na Loughboroughské univerzitě ve Spojeném království [5]. Autoři tohoto protokolu navrhli kompletní, detailně popsaný postup pro experimentální zjištění baktericidních účinků plazmatických aplikátorů využívajících NTP a zároveň poskytly (naměřili) referenční hodnoty, se kterými je možné výsledky nových experimentů porovnávat. Protokol byl sestaven na základě požadavky po univerzální metodě, díky níž by se dali porovnávat baktericidní účinky různých plazmatických aplikátorů, jež do té doby neexistovala.

Porovnávání výsledků různých experimentů zabývajících se baktericidními účinky netermálního plazmatu je silně závislé na použitém mikroorganismu, jak z hlediska jeho druhu, tak i postupu přípravy a růstového stádia, ve kterém byl plazmatem ošetřován. Pokud by se porovnávaly dva experimenty, které využívají různé mikroorganismy, připravené různými způsoby a ošetřované v různých stádiích, výsledky obou experimentů budou těmito faktory natolik ovlivněny, že je není možné porovnávat.

Autoři referenčního protokolu [5] proto přišli s detailně popsanou metodou experimentálního zkoumání, která se snaží maximum těchto faktorů eliminovat. Hlavní výhodou této metody je její robustnost, nízká ovlivnitelnost a variabilita, která byla dosažena volbou konkrétního použitého mikroorganismu, zformulováním detailního popisu jeho přípravy, výběrem metody, která nanáší daný mikroorganismus na ošetřované medium, a podrobným popisem způsobu kultivace ošetřených kultur.

Pro účely této metody byly autory protokolu vybrány spory bakterie *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) jako referenční mikroorganismus, který má být ošetřován pomocí NTP. Tato bakterie bude více popsána a její volba bude podrobně zdůvodněna v následující části 4.2.1.

Postup přípravy základní suspenze bakteriálních spor druhu *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) je v rámci protokolu podrobně popsán, viz. [5]. Tímto způsobem se autoři protokolu snaží snížit variabilitu experimentální metody, která je často způsobena odchylkami ve způsobu přípravy ošetřovaných kultur. Tyto odchylky pak mohou vést i ke značným rozdílům ve výsledcích ošetření plazmatem a opět způsobit neporovnatelnost experimentů mezi sebou.



Pro ošetření netermálním plazmatem byly zvoleny membrány typu Nucleopore track-etched polycarbonate membrane (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) o průměru 25 mm a velikosti póru 0,2  $\mu$ l, na něž je pomocí filtrace nanášena zředěná základní suspenze bakteriálních spor. Metoda filtrace, namísto běžně používaného pipetování, byla vybrána, protože umožňuje výrobu homogenní monovrstvy spor na membránci. Výroba monovrstvy je velice důležitá, neboť zabraňuje stínění různých míst membrány a expozice plazmatem je tak pro všechny spory více méně stejná. Filtrace tedy zaručuje nízkou variabilitu experimentů z hlediska vystavení bakteriálních spor plazmatu.

Posledním bodem metody referenčního protokolu je kultivace bakterií po ošetření plazmatem. V rámci protokolu je podrobně popsán způsob oplachování ošetřených membránek a následná kultivace získaného roztoku, tak, aby se zabránilo ovlivňování výsledků na základě množství opláchnutých spor, viz. [5].

A právě z těchto důvodů byl tento protokol vybrán pro studium a porovnání baktericidních účinků MiniJetu a plazmatického aplikátoru PAZk v této bakalářské práci.

Obecně lze postup metody představené v protokolu, která byla použita pro účely experimentálního výzkumu této práce, shrnout do 4 základních kroků [5]:

1. Výroba základní suspenze bakteriálních spor.
2. Ředění a filtrace suspenze na membrány, jež budou následně ošetřovány plazmatem.
3. Ošetření membránek netermálním plazmatem.
4. Kultivace a vyhodnocení výsledků.

V následující části bude představen mikroorganismus použitý v referenčním protokolu a budou uvedeny důvody, na jejichž základě byl autory protokolu vybrán. Dále budou popsány mikrobiologické postupy metody referenčního protokolu, kterými byly zkoumány baktericidní účinky studovaných plazmatických aplikátorů.

#### 4.2.1 Použitý mikroorganismus

Pro účely této bakalářské práce, tj. zkoumání možností medicínského využití záporného korónového výboje a plazmové trysky, byly, na základě referenčního protokolu [5], použity spory bakterie *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

*Bacillus subtilis*, tj. bacil senný, je bakterie tyčkovitého tvaru, viz. obrázek 4.4, jež patří do skupiny Gram-pozitivních bakterií [37]. Jde o nepatogenní bakterii žijící převážně v půdě, díky čemuž se také přirozeně vyskytuje v zažívacím traktu zvířat a lidí. Díky své nepatogenitě a širokému rozšíření je *Bacillus subtilis* hojně využíván v různých mikrobiologických experimentech jako pracovní mikroorganismus.

Další důležitou vlastností této bakterie a celého rodu *Bacillus* je schopnost vytvářet endospory (spory vytvářené zevnitř bakterie) [36]. Proces sporulace, tj. tvorba bakteriálních spor, je esenciální pro přežívání bakterií v životě nepříznivých podmínkách. Změní-li se vnější podmínky prostředí, ve kterém bakterie žije, na nehostinné, tento mikroorganismus přejde do klidového stádia (spora). Na povrchu buněčné stěny se vytvoří ochranné vrstvy jako kortex (vrstva peptidoglykanů), proteinový plášť aj., které bakterii chrání a znemožňují vnějším činitelům proniknout do vnitřní části buňky [47]. Bakteriální buňka se zároveň zbaví téměř veškeré vody a zůstane tak v podstatě jen genetická informace obalená ochrannými obaly.

V klidovém stádiu buňky neprobíhají žádné metabolické procesy a bakterie se stává vysoce odolnou vůči různým fyzikálním a chemickým vlivům a může tak v nehostinném prostředí přežít až tisíce let.





Obrázek 4.4: Snímek kolonií *Bacillus subtilis* ze skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) [48].

Bakterie *Bacillus subtilis* ve stádiu spory byla pro účely referenčního protokolu vybrána z několika důvodů [5].

Prvním důvodem výběru bakterie druhu *B. subtilis* byl její nepatogenní charakter, který neklade vysoké nároky na zajištění biologické bezpečnosti pracoviště. Na rozdíl od nebezpečnějších bakterií, např.: methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* – MRSA, tak může být využívána například i ve fyzikálních laboratořích.

Dalším důvodem byla schopnost této bakterie tvořit spory, které je možné uchovávat po dlouhou dobu, aniž by došlo k významnému snížení jejich životaschopnosti.

K ošetření byly vybrány bakterie v klidovém stádiu (spory), neboť tak mohla být zajištěna větší robustnost experimentu z hlediska vlivu teploty. Vzhledem k tomu, že bakteriální spory nejsou citlivé na malé výkyvy tepla, je jejich použití ideální při porovnávání různých typů plazmatických aplikátorů, neboť zaručuje eliminaci vlivu rozdílu teplot plazmatu jednotlivých aplikátorů.

Zároveň použití bakteriálních spor snižuje variabilitu experimentu oproti použití živých bakterií, z hlediska růstového stádia, ve kterém se ošetřovaná bakterie nachází. Růstový cyklus bakterií má 4 základní stádia a v každém z nich vykazuje bakterie jinou odolnost vůči vnějším činitelům. Proto je potřeba při každém experimentu používat bakterie ve stejném stádiu růstu, jinak nebudou výsledky porovnatelné. Tato podmínka ale značně zpomaluje experimentální postup, neboť je nutné vzorek bakterií pokaždé znovu vytvořit. Naproti tomu bakteriální spora se nachází pouze v jednom stádiu a je tak možné ji používat ve více experimentech, aniž by došlo k významným změnám.

#### 4.2.2 Použité mikrobiologické postupy

Nyní budou podrobněji popsány mikrobiologické postupy metody referenčního protokolu [5] použité k experimentálnímu zkoumání baktericidních účinků obou studovaných plazmatických aplikátorů.

##### Výroba základní bakteriální suspenze

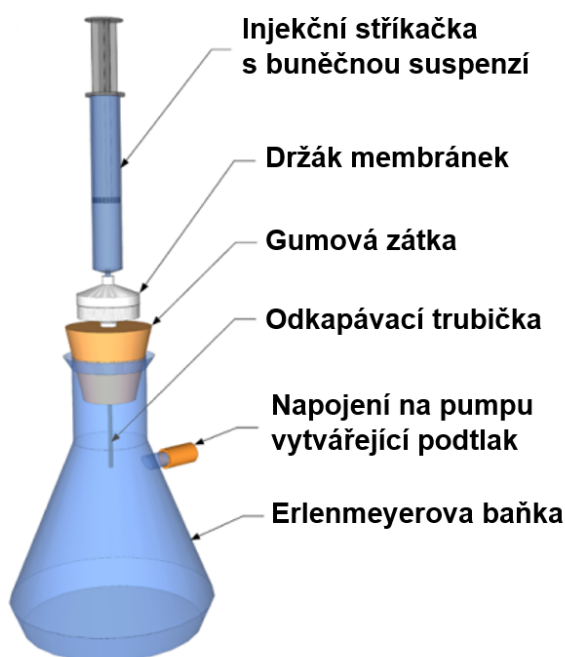
Z důvodu popsaných v předchozí části používá referenční protokol pro zkoumání baktericidních účinků plazmatických aplikátorů spory bakterie *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Pro účely této bakalářské práce byl vzorek *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) obdrženo přímo od autorů referenčního protokolu.

Základní suspenze obsahující spory této bakterie o koncentraci  $10^6$  CFU/ml byla připravena podle přesných parametrů a podmínek popsanych v protokolu [5]. Jednotka CFU/ml (CFU=Colony Forming Unit) představuje množství bakterií v 1 ml, jež jsou schopné množit se a vytvářet kolonie.

### Ředění a filtrace suspenze na membránky

Základní suspenze bakteriálních spor o koncentraci  $10^6$  CFU/ml byla před provedením filtrace naředěna na výslednou koncentraci  $10^3$  CFU/ml. Tato koncentrace je nižší, než koncentrace uvedená v referenčním protokolu, a byla zvolena na základě snadnějšího nanášení na membránky.

Filtrace bakteriální suspenze o koncentraci  $10^3$  CFU/ml na membránky byla provedena pomocí filtrační aparatury, která je schematicky zobrazena na obrázku 4.5, odpovídající aparatuře použité v referenčním protokolu. K nanášení suspenze byly vybrány membránky typu Nucleopore track-etched polycarbonate Membrane (výrobce Whatman) o průměru 25 mm a velikosti  $0,1 \mu\text{l}$ , neboť membránky uvedené ve referenčním protokolu se už nevyrábějí.



Obrázek 4.5: Schéma použité filtrační aparatury [5].

Na 1 membránku bylo vždy, pomocí filtrace, injekční stříkačkou deponováno 10 ml bakteriální suspenze. Suspenze byla filtrována pod tlakem 32 - 42 kPa. Doba filtrace pro jednotlivé membránky se pohybovala v rozmezí jednotek až několika desítek minut. Výsledná koncentrace bakteriálních spor na membránce, zjištěná zpětnou analýzou, byla  $5 \cdot 10^4$  CFU/membránka.

Celkem bylo připraveno 9 membránek, osm z nich určených k ošetření netermálním plazmatem, jedna ponechána neošetřená jako kontrolní, viz. Kapitola 5. Po depozici bakteriální suspenze byly membránky přeneseny na Petriho misky s živným agarem (MH agar).

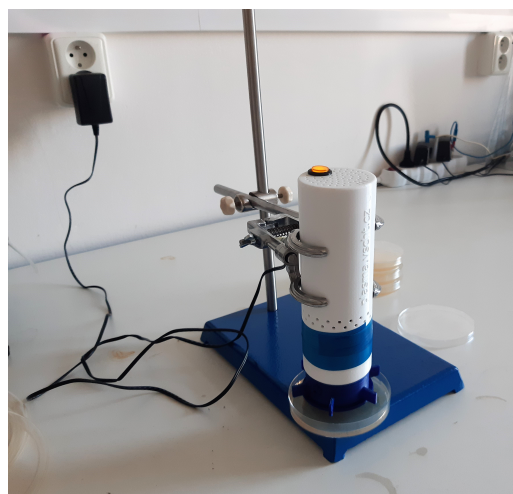
Kontrola přítomnosti spor a homogenity filtrace byla provedena dvěma způsoby. Kultivací kontrolní membránky, na které byl následně pozorován viditelný rovnoměrný povlak bakterií (makroskopicky homogenní pokrytí). A pomocí skenovacího elektronového mikroskopu (SEM), kde byly vidět jednotlivé spory a jejich rozmístění.

## Ošetření membránek netermálním plazmatem

Membrány pokryté bakteriální suspenzí byly ošetřovány 2 plazmatickými aplikátory: MiniJetem Pm - 10.R a plazmatickým aplikátorem PAzk. Každým přístrojem byly ošetřeny 4 membrány. Vzdálenost konce výboje od membrány byla udržována konstantní na hodnotě 15 mm. Experimentální uspořádání při ošetřování membránek oběma přístroji je vidět na obrázku 4.6.



(a) MiniJet PM - 10.R.



(b) Plazmatický aplikátor PAzk.

Obrázek 4.6: Experimentální aparatura: ošetřování membránek pokrytých bakteriální suspenzí spor *Bacillus subtilis* na Petriho miskách pomocí netermálního plazmatu.

Nejprve bylo provedeno ošetření 4 membránek pomocí MiniJetu, viz. obrázek 4.6a. Výkon generátoru byl nastaven na 5 W a průtok argonu na 1,5 l/min. Ošetřovací časy byly zvoleny následovně: 30, 40, 50 a 60 min.

Následně byly ošetřeny další 4 membrány pomocí plazmatického aplikátoru PAzk, obrázek 4.6b, po dobu 4 různých ošetřovacích časů: 75, 90, 105 a 120 min.

Časy ošetření u obou přístrojů byly určeny na základě předchozích měření, aby co nejlépe demonstrovali jejich baktericidní účinky.

## Kultivace a vyhodnocení výsledků

Pro vyhodnocení výsledků nabízí referenční protokol metodu omývání membránek a následnou kultivaci získaného roztoku přímo na agaru. Avšak tato metoda není vhodná pro vyhodnocování baktericidních účinků přístrojů s tak odlišnými aktivními zónami, jako je fokusovaný MiniJet a plošný plazmatický aplikátor PAzk. Proto byla pro účely této bakalářské práce vybrána modifikace metody navržená v práci Khuna a spol. (2017) [32], která navrhuje kultivaci membránek přímo na agaru, což je pro účely této práce vhodnější.

Po ošetření membránek netermálním plazmatem byly tedy všechny Petriho misky umístěny přes noc do inkubátoru o teplotě 37,3°C. Následně bylo provedeno vyhodnocení baktericidních účinků obou přístrojů pomocí pozorování inhibičních zón a komparativní analýzy.

Celý postup byl proveden jedenkrát bez opakování a všechny membrány byly plazmatem ošetřeny během jednoho dne. Výsledky ošetření jednotlivými přístroji jsou podrobně rozebrány v následující kapitole.

## Kapitola 5

# Výsledky a diskuze

V první části této kapitoly budou předneseny výsledky experimentální části práce. Nejprve bude provedeno srovnání jednotlivých parametrů MiniJetu Pm - 10.R a plazmatického aplikátoru PAzk. Následně budou vyhodnoceny výsledky zkoumání baktericidních účinků obou plazmatických přístrojů.

Ve druhé části kapitoly pak budou získané výsledky diskutovány s ohledem na potenciální využití záporného korónového výboje a plazmové trysky pro medicínské účely a budou navrženy potenciální navazující experimenty, které by mohly poskytnout další důležité informace ohledně fungování obou přístrojů.

### 5.1 Výsledky experimentální části práce

Nyní budou předneseny výsledky experimentálního měření této práce. Nejprve budou studované plazmatické aplikátory srovnány na základě jejich fyzikálních a technických parametrů. Ve druhé části pak budou prezentovány a porovnávány naměřené baktericidní účinky obou zkoumaných přístrojů.

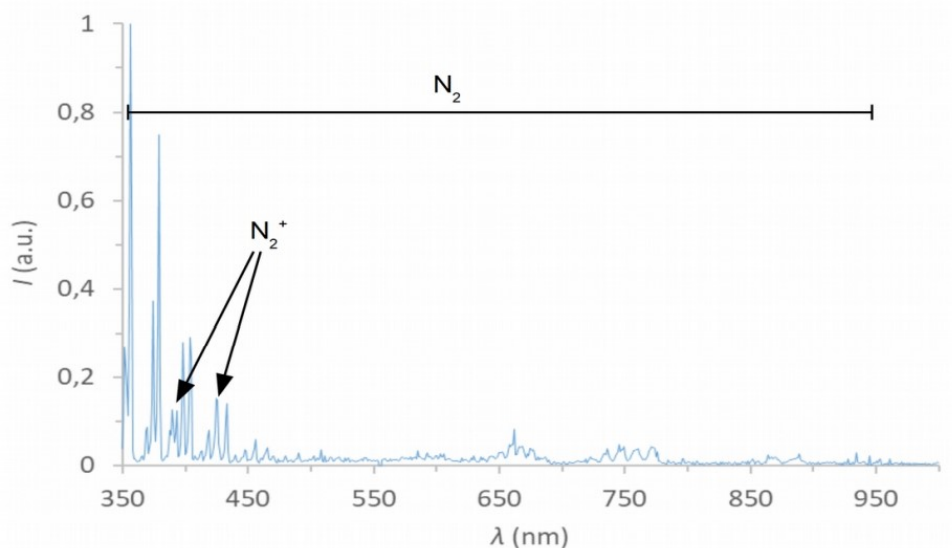
#### 5.1.1 Porovnání parametrů studovaných plazmatických aplikátorů

Nejprve budou studované přístroje porovnány na základě jejich fyzikálních parametrů. V případě obou aplikátorů se jedná o přístroje generující netermální plazma za atmosférického tlaku.

Jedním z hlavních rozdílů mezi oběma přístroji je druh pracovního plynu, který používají. MiniJet využívá jako pracovní plyn argon. Naproti tomu plazmatický aplikátor PAzk pracuje se vzduchem. Na obrázku 5.1 níže je vidět emisní spektrum plazmatického aplikátoru PAzk měřené v těsné blízkosti hrotové elektrody uvnitř aplikátoru pomocí spektrometru Ocean Optics USB-650 RED TIDE (350 – 1000 nm) [22]. Z obrázku je patrné, že hlavní složkou produkovanou netermálním plazmatem v blízkosti hrotové katody jsou kationy dusíku ( $N_2^+$ ) na rozdíl od MiniJetu jehož hlavním produktem v blízkosti elektrod jsou nejspíš argonové kationy ( $Ar^+$ ), viz. Kapitole 1.1.

V případě MiniJetu se tedy generují pouze sekundární RONS při kontaktu argonového plazmového výboje se vzduchem na rozdíl od aplikátoru PAzk, jenž generuje jak primární tak sekundární RONS.

Dalšími důležitými rozdíly mezi oběma přístroji jsou zdroj elektromagnetického pole a typ výboje, kterým je netermální plazma generováno. V případě MiniJetu je elektrické pole mezi elektrodami generováno pomocí mikrovlnného signálu o frekvenci 2,45 GHz. Typ výboje nelze přesně určit neboť nejsou známy konkrétní tvary a uspořádání elektrod, mezi kterými je plazma generováno. Plazmatický aplikátor PAzk naproti tomu jako zdroj elektrického pole využívá stejnosměrný proud a plazma je generováno pomocí záporného korónového výboje. MiniJet však na rozdíl od plazmatického aplikátoru PAzk nepotřebuje ke generaci výboje mezi elektrodami zdroj vysokého napětí.



Obrázek 5.1: Emisní spektrum plazmatického aplikátoru PAzk [22].

Z technického hlediska jde o dva velmi odlišné přístroje. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, MiniJet PM - 10.R je již certifikovaný přístroj na rozdíl od plazmatického aplikátoru PAzk, jež byl vyroben na VŠCHT v Praze a zatím se nachází v testovací fázi.

Výkon MiniJetu je nastavitelný a může dosahovat hodnot 2 až 10 W na rozdíl od plazmatického aplikátoru PAzk, jehož výkon je poměrně nízký a fixní na hodnotě 1 W.

Na druhou stranu z hlediska pořizovací ceny a nákladů na provoz je mnohem dostupnější plazmatický aplikátor PAzk, díky nízkým nákladům na výrobu (vytištěno na 3D tiskárně) a volbě pracovního plynu (vzduch). Oproti tomu pořizovací cena MiniJetu PM - 10.R je 2 990 € [49] bez argonové bomby, kterou je nutné v rámci používání přístroje dokupovat podle potřeby.

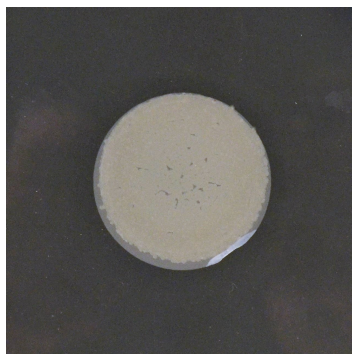
Z pohledu bezpečnosti a náročnosti manipulace a údržby je také výrazně výhodnější plazmatický aplikátor PAzk. Díky své nízké váze a malému rozměru je snadno přenosný, skladovatelný a manipulace s ním nevyžaduje odborné znalosti, což může být velkou výhodou v případě aplikace v medicíně. Naproti tomu MiniJet vyžaduje pravidelné doplňování argonových bomb, které kvůli své váze výrazně sťažují manipulaci s celým přístrojem při případném převozu. Zároveň je pro zapálení plazmatu, viz. podkapitola 4.1, vyžadována přesná znalost postupu.

### 5.1.2 Baktericidní účinky MiniJetu PM - 10.R a plazmatického aplikátoru PAzk

V rámci experimentálního zkoumání baktericidní účinnosti obou plazmatických přístrojů bylo provedeno několik sérií ošetření membránek připravených podle postupu popsaného v předchozí kapitole. Cílem bylo najít takové časy ošetření pro MiniJet a plazmatický aplikátor PAzk, jejichž baktericidní účinky by byly srovnatelné a na jejichž základě by následně mohly být oba přístroje porovnány. Níže jsou uváděny výsledky pouze jednoho průkazného měření, neboť díky nedostatečné praxi došlo k hrubým (systematickým) chybám při přípravě membránek pro předešlá měření. Z tohoto důvodu byly získané výsledky neprůkazné a nebudou zde uváděny.

V rámci měření baktericidních účinků obou zkoumaných přístrojů byla vyčleněna jedna membránka, která nebyla plazmatem ošetřována a jež sloužila jako kontrola přítomnosti bakterií, viz. obrázek 5.2. Z

obrázku je patrné, že došlo k nanesení suspenze na membránku, na které byly následně nakultivovány bakterie (světle šedivý povlak na membránce).



Obrázek 5.2: Kontrolní membránka: fotografie povrchu membránky po kultivaci v inkubátoru.

Na základě pozorování povrchu membránky, obrázek 5.2, lze nanesení bakteriálních spor na membránku označit za makroskopicky homogenní. Drobná šedivá místa ve středu membránky mohou být mezery mezi bakteriálními koloniemi způsobené nízkou koncentrací bakterií v pracovní suspenzi. Na základě tohoto výsledku je možné předpokládat, že i zbývající membránky připravené filtrací jsou sporama pokryty homogenně.

Nejprve bylo provedeno ošetření 4 membránek pomocí MiniJetu. Výsledky ošetření membránek po kultivaci bakterií, včetně kontrolní membránky, jsou vidět na obrázku 5.3 níže. Konečné ošetřovací časy 30, 40, 50 a 60 minut byly zvoleny na základě předchozích testovacích měření tak, aby co nejlépe demonstrovaly baktericidní účinky MiniJetu.

Z porovnání membránek ošetřovaných po různé časy, obrázky 5.3b - 5.3e, je vidět přímá úměrnost mezi rostoucím časem nekontaktního ošetření a zvyšující se baktericidní účinností MiniJetu. Z obrázku 5.3e, na kterém je snímek membránky ošetřované po dobu 60 minut, lze z velikosti inhibiční zóny odhadnout snížení CFU na membránce přibližně o 50%.

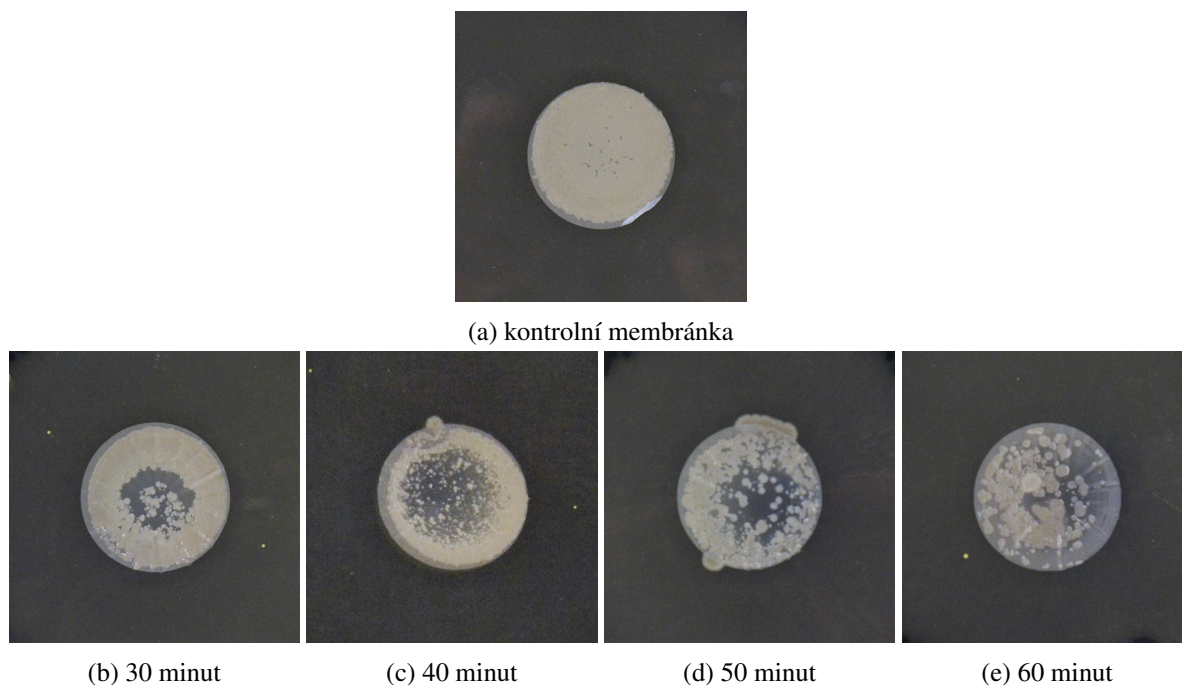
Dalším jevem, který je viditelný při srovnání jednotlivých časů ošetření, je rostoucí inhibiční zóna, plocha na které se baktericidní účinky MiniJetu projevují, mezi ošetřením po dobu 30 (obrázek 5.3b) a 40 (obrázek 5.3c) minut. Při nejkratším čase ošetření (obrázek 5.3b) jsou zahubeny bakterie (tmavě šedivá oblast na membránce) pouze ve středu membránky, ale s rostoucím časem ošetření, obrázek 5.3c, začínají být hubeny i bakterie ve větší vzdálenosti od plazmatu a celková zasažená oblast se zvětšuje. Tento průběh ošetření membránek je pravděpodobně způsoben rozložením reaktivních částic NTP v plasma afterglow.

Jak již bylo řečeno dříve (Kapitola 2), plasma afterglow je proud částic kuželovitého tvaru, ve kterém koncentrace částic s rostoucí vzdáleností od středu klesá. Největší koncentrace těchto částic se tedy soustředí ve středu plasma afterglow (díky tvaru plazmové trysky), a tím pádem i při kratším čase ošetření může být těchto částic dostatečné množství, aby měly cidní účinky na bakteriální spory ve středu membránky. S rostoucí vzdáleností od středu membránky přichází do kontaktu s bakteriálními sporama stále menší množství reaktivních částic, a je tedy zapotřebí mnohem delšího času ošetření, aby došlo k nakuumulování dostatečného množství částic, jež by mělo za následek viditelné baktericidní účinky.

Velikost inhibiční zóny vzhledem k vysoké fokusaci plazmového výboje (maximální průměr výboje je 6 mm) byla překvapivým výsledkem tohoto experimentu a je přičítána zejména 15 mm vzdálenosti konce plazmatického výboje od ošetřované membránky. Tato vzdálenost má s velkou pravděpodobností za následek prodloužení času ošetření nutného k projevení baktericidních účinků, a stejně tak zvětšení oblasti ošetření a umožňuje tak nejen fokusované, ale do jisté míry i plošné ošetření pomocí MiniJetu.



Zde je však potřeba podotknout, že se jedná o plošné ošetření opravdu v malém měřítku, neboť průměr membránky je pouze 25 mm.



Obrázek 5.3: Kontrolní membránka a membránky ošetřené MiniJetem Pm - 10.R v časových úsecích 30, 40, 50 a 60 minut.

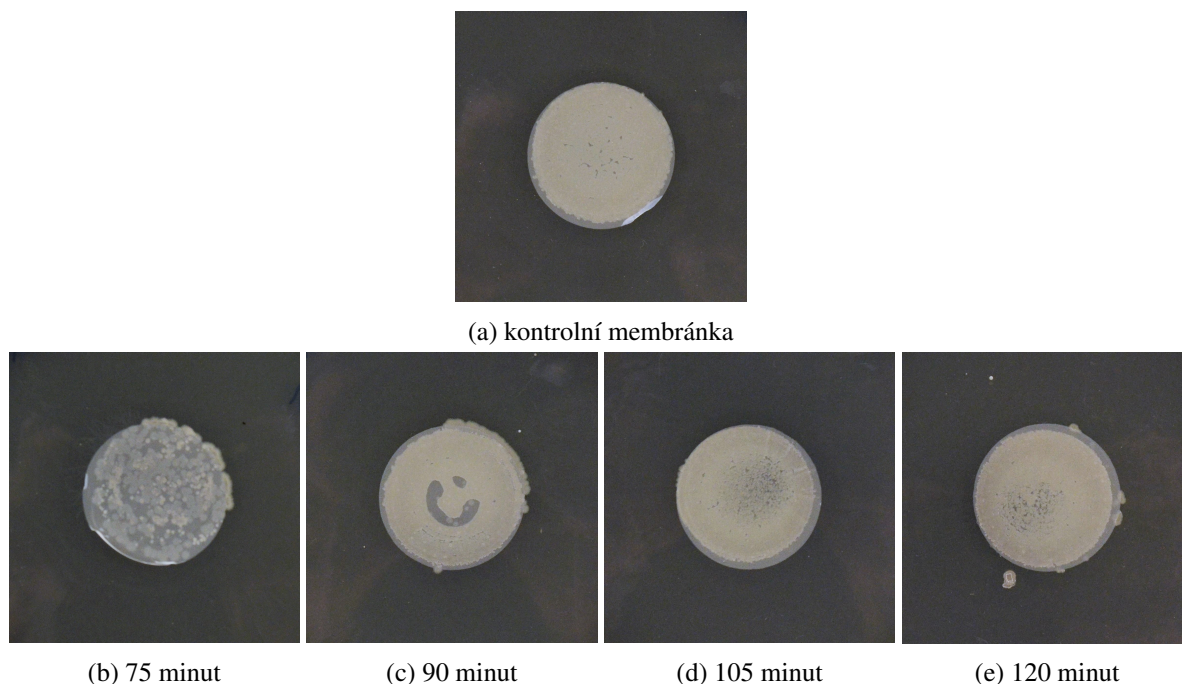
Dále byly ošetřeny 4 membránky pomocí plazmatického aplikátoru PAzk. Výsledky tohoto ošetření po kultivaci bakterií, včetně kontrolní membránky, jsou vidět na obrázku 5.4 níže.

Z porovnání výsledků pro různé časy ošetření, které byly nastaveny maximální možné, aby byl ještě celý experiment proveden v rámci jednoho dne, lze vyzorovat pouze slabé rostoucí tendence baktericidních účinků aplikátoru PAzk. Rostoucí tendence jsou patrné především při porovnání ošetřovacích časů 90 a 105 minut, obrázky 5.4c a 5.4d, kdy až po vystavení membránky netermálnímu plazmatu po dobu 105 minut lze pozorovat určité prořidnutí bakteriálních kolonií ve středu membránky. Nicméně i toto porovnání může být zkreslené, neboť, jak je patrné z obrázku 5.4c, došlo k chybě při přípravě membránky. Ve středu membránky, jež byla ošetřována 90 minut, je vidět velice pravidelně ohraničené místo, na němž se v podstatě nevyskytují žádné bakterie. Přílišná hladkost ohraničeného místa v porovnání s baktericidními účinky viditelnými po 105 minutách ošetření na obrázku 5.4d napovídá, že nepřítomnost bakterií není způsobena účinky netermálního plazmatu nýbrž odchlípnutím nanesených bakteriálních spor při vyndávání membránky z držáku po filtraci, popřípadě nedokonalé homogenní depozici spor na membránku.

Na obrázku 5.4e je vidět membránka po 120 minutách ošetření. Rozdíl mezi baktericidními účinky aplikátoru PAzk po 105 a 120 minutách působení netermálního plazmatu na membránky je zanedbatelný.

Speciálním případem je výsledek ošetření membránky po 75 minutách, který je vidět na obrázku 5.4b. Při porovnání povrchu membránky s kontrolní membránkou 5.4a a ostatními ošetřenými membránkami je patrné, že zde muselo dojít buďto k chybě v rámci přípravy membránky a nebo ke změně podmínek experimentu.. Tento výsledek proto nelze považovat za průkazný.

Nyní budou naměřené baktericidní účinky obou studovaných přístrojů diskutovány a v rámci možností porovnány.



Obrázek 5.4: Kontrolní membránka a membránky ošetřené plazmatickým aplikátorem PAzk v časových úsecích 75, 90, 105 a 120 minut.

Na základě výsledků experimentálního měření vykazuje MiniJet výrazně vyšší baktericidní účinky než plazmatický aplikátor PAzk. U MiniJetu byly pozorovány významnější baktericidní účinky již po třiceti minutách bezkontaktního ošetření, naproti tomu u plazmatického aplikátoru se první známky baktericidnosti projevily až po 105 minutách bezkontaktního ošetření a to jen ve velmi malé míře. Avšak vzhledem k tomu, že oba přístroje pracují na jiném výkonu, nelze jejich baktericidní účinky přímo srovnávat.

Z hlediska způsobu aplikace obou přístrojů je u MiniJetu možné využít jak kontaktního tak bezkontaktního způsobu ošetření. Na základě teoretických znalostí plazmových trysek (Kapitola 2) je možné předpokládat vysokou účinnost tohoto přístroje fokusovanou na velmi malou oblast v případě kontaktního způsobu ošetření. Pro tento MiniJet jde o kruhovou oblast o průměr 6 mm [46]. Díky výsledkům experimentálního měření baktericidních účinků MiniJetu je možné tvrdit, že při použití bezkontaktního způsobu ošetření lze dosáhnout značných baktericidních účinků i na méně fokusované oblasti o průměru 25 mm (průměr ošetřované membránky).

Naproti tomu je plazmatický aplikátor PAzk, již z podstaty své konstrukce, určen pouze k bezkontaktnímu způsobu ošetření, kdy se díky rozptylové mřížce může jednat i o rovnoměrné ošetřování ploch mnohonásobně větších než v případě MiniJetu Pm - 10.R a to o velikosti až 1 963 mm<sup>2</sup>. Přídavný nástavec navíc umožňuje používat tento přístroj i pro ošetřování ploch v uzavřeném objemu, což může mít za následek zvýšení jeho baktericidních účinků [32].

## 5.2 Diskuze

V předchozí části kapitoly byly předneseny výsledky experimentální části této práce a provedeno srovnání MiniJetu PM - 10.R a plazmatického aplikátoru PAzk. Nyní budou získané poznatky diskutovány a následně budou navržena možná uplatnění studovaných aplikátorů v rámci medicíny.



Z experimentálního měření baktericidních účinků obou přístrojů vychází MiniJet jako účinnější. Baktericidnost se ve větší míře projevila již po 30 minutách ošetření na rozdíl od plazmatického aplikátoru PAzk, jenž začal vykazovat mírné účinky až po 105 minutách ošetření.

Vzhledem ke konfiguraci celého experimentu v kombinaci s technickými a fyzikálními parametry obou přístrojů se nabízí několik možných vysvětlení tak významného rozdílu v účinnosti.

Prvním vysvětlením může být rozdíl ve fokusaci plazmového výboje a plasma afterglow obou přístrojů. V případě MiniJetu jde o silně fokusovaný výboj, koncový průměr trysky je 6 mm [46], který tak, na malé ploše membrány při bezkontaktním ošetření, může produkovat vysokou koncentraci reaktivních částic. Naproti tomu plazmatický aplikátor PAzk je určen především pro ošetření velkých ploch o velikosti až 1 963 mm<sup>2</sup>, což vede k rozptýlení reaktivních částic na mnohem větší plochu než je plocha samotné membrány. Výsledné množství reaktivních částic, které přijdou do kontaktu s bakteriálními sporami na povrchu membrány, tak může být mnohem menší než v případě fokusovaného výboje MiniJetu. A tím pádem se i baktericidní účinky plazmatického aplikátoru PAzk jeví nižší než účinky MiniJetu.

Dalším vysvětlením tak velkého rozdílu mezi baktericidními účinky studovaných přístrojů může být poměrně vysoký rozdíl mezi výkony obou přístrojů. Jak ve své práci uvádí Liao a spol. (2016) [6] baktericidní účinky plazmatických aplikátorů jsou přímo závislé na velikosti jejich výkonu, vstupního napětí a frekvenci. Během ošetřování membránek byl výkon MiniJetu nastaven na 5 W, zatímco výkon plazmatického aplikátoru PAzk byl pouze 1 W. Vyšší výkon v případě MiniJetu mohl mít za následek generaci většího množství reaktivních částic v rámci NTP, což způsobilo vyšší baktericidní účinky přístroje.

Aby mohl být vliv výkonu na baktericidní účinky obou studovaných přístrojů v rámci jejich porovnání zanedbán, bylo by potřeba nastavit výkon u obou aplikátorů na stejnou hodnotu. To však z hlediska jejich technických parametrů není možné. Plazmatický aplikátor PAzk má fixně stanovenou hodnotu výkonu 1 W. MiniJet při nastavení výkonu na 1 W negeneruje žádné plazma, jeho operační rozsah výkonu je 2 - 10 W. Z tohoto důvodu bylo nutné zkoumat baktericidní účinky obou přístrojů při různě nastavených výkonech. V případě MiniJetu byl výkon nastaven na střední hodnotu 5 W.

Vzhledem k tomu, že baktericidní účinky obou přístrojů byly měřeny na základě referenčního protokolu [5], je možné výsledky měření této práce velmi dobře porovnat s dalšími výzkumy, jenž používaly metodu představenou v referenčním protokolu, například práce Khuna a spol. (2017) [32]. A také s výsledky samotného referenčního protokolu [5].

Khun a spol. (2017) [32] ve své práci měřili mimo jiné i baktericidní účinky záporného korónového výboje. Jako pracovní plyn byl použit vzduch. Měření baktericidních účinků bylo prováděno jak v otevřeném tak uzavřeném objemu v konfiguraci elektrod point-to-plane (hrot-plošná elektroda). Na základě ošetření záporným korónovým výbojem v otevřeném objemu po dobu 60 minut klesla bakteriální populace na membránkách jen velmi málo o 10-20%.

V porovnání s výsledky plazmatického aplikátoru PAzk je účinnost dosažená záporným korónovým výbojem v otevřeném objemu v práci [32] výrazně vyšší. Tento rozdíl si lze vysvětlovat odlišností mezi oběma experimentálními aparaturami. V případě [32] byly ošetřované membrány umístěny přímo na uzemněnou plošnou elektrodu v konfiguraci point-to-plane a byly tak od hořícího záporného korónového výboje vzdáleny jen 5 mm. Na rozdíl od membránek ošetřovaných pomocí aplikátoru PAzk, které byly umístěny do vzdálenosti 15 mm od hořícího výboje. Z tohoto rozdílu je patrné, že membrány ošetřované aplikátorem PAzk nejspíše přišly do styku s menším počtem reaktivních částic než v případě záporného korónového výboje v práci [32].

Naproti tomu výsledky MiniJetu, který po 60 minutách ošetření v otevřeném objemu vyhubil přibližně 50% bakteriální populace na membránce, se, v porovnání s výsledky záporného korónového výboje v otevřeném objemu [32], jeví více než dvojnásobné. Nicméně i v případě tohoto porovnání je potřeba zdůraznit rozdíl mezi výkony obou přístrojů, kdy je opět výkon MiniJetu podstatně vyšší a může tak být původcem vyšší baktericidní účinnosti [6].

Nicméně výsledky jak této práce, tak i práce Khuna a spol. (2017) [32] naznačují poměrně nízkou účinnost plazmatických aplikátorů při ošetřování bakteriálních spor bezkontaktním způsobem v otevřeném objemu.

Naproti tomu, jak vyplývá z výsledků Khuna a spol. (2017) [32] a referenčního protokolu [5] při experimentech v uzavřeném objemu, se účinnost plazmatických aplikátorů výrazně zvyšuje. V případě ošetřování membránek záporným korónovým výbojem, popsáným výše, v uzavřeném objemu klesl počet bakteriálních kolonií na membránkách až o sedm řádů a baktericidní účinnost po 60 minutách tak byla téměř stoprocentní (99,99999%) [32]. V případě referenčního protokolu [5], byly zkoumány baktericidní účinky na zakázku vyrobeného přístroje využívajícího jako zdroj NTP dielektrický bariérový výboj. Ošetření membránek bylo prováděno bezkontaktně, v uzavřeném objemu ve vzdálenosti 9 mm od zdroje plazmatu. Po 60 minutách ošetření klesl počet CFU na membránkách o čtyři řády, tedy o 99,99%.

Tento signifikantní rozdíl baktericidních účinků při ošetřování v uzavřeném objemu oproti otevřenému objemu je pravděpodobně způsoben zabráněním úniku reaktivních částic vygenerovaných plazmatem do okolí. Díky tomu je zvýšena jejich koncentrace při interakci s bakteriálními spory, což vede k vyšším baktericidním účinkům NTP.

Ze srovnání výsledků experimentálního měření této bakalářské práce a výše zmíněných prací [5], [32] vyplývá možné řešení, jakým způsobem zvýšit baktericidní účinky obou zkoumaných přístrojů, a to provádět s nimi ošetření v uzavřených objemech. V případě plazmatického aplikátoru PAzk by tato modifikace neměla být problém. Samotný aplikátor byl již konstruován jako přístroj s uzavřeným objemem. Díky přídavnému nastavci je možné ošetřovaný vzorek umístit pod rozptylovou mřížku do uzavřeného prostoru mezi stěny nastavce a rovnou pracovní plochu a zamezit tak úniku reaktivních částic mimo ošetřovanou oblast. V této práci byl plazmatický aplikátor PAzk použit v otevřeném objemu pro účely porovnání obou studovaných přístrojů

Na rozdíl od aplikátoru PAzk je však tato modifikace v případě MiniJetu PM - 10.R v podstatě nemožná. MiniJet je plazmová tryska využívající k transportu plazmatu k místu ošetření plyn (argon) a tedy už z podstaty jeho konstrukce ho nelze umístit do uzavřené aparatury, aniž by tam nebyl umístěn i přídavný generátor. Ovšem v případě uzavření přístroje do tak velkého objemu, výhody této konfigurace postrádají svůj význam. Reaktivní částice by z ošetřované oblasti stejně unikaly do zbytku uzavřeného objemu.

V případě MiniJetu se tak nabízí jiný způsob zvýšení baktericidní účinnosti, a to pomocí zvýšení jeho výkonu (nastavitelný rozsah 2 - 10 W, v této práci byl použit výkon 5 W). Nicméně v případě medicínské aplikace MiniJetu je zde možné riziko popálení tkáně pacienta, při použití příliš vysokého výkonu, a je tak nezbytné provést nejprve testovací měření pro vyšší výkon.

Vzhledem k tomu, že dosud nebyl proveden výzkum baktericidní účinnosti argonové plazmové trysky s využitím referenčního protokolu [5], budou nyní porovnány výsledky naměřené pro MiniJet s výsledky dvou studií [50] a [51] zabývajících se ošetřováním spor *Bacillus Subtilis* pomocí plazmové trysky využívající jako pracovní plyn argon. K porovnání byly vybrány právě tyto dvě studie, neboť se svými parametry blíží parametrům experimentu prováděného v této práci.

Práce Hertwiga a spol. (2015) [50] se zabývala studiem ošetřování spor *Bacillus subtilis* (PS832) pomocí argonové plazmové trysky o výkonu 30 W. Spory byly naneseny (pipetováním) na Petriho misku o průměru 30 mm a ošetřovány ve vzdálenosti 12 mm od konce plazmového výboje v časovém rozmezí 0 - 5 minut. Výsledky této práce ukazují redukci bakteriální populace na Petriho misce o necelé tři řády po 5 minutách ošetření, přibližně tedy o 99,8%.

V porovnání s výsledky této práce jsou baktericidní účinky MiniJetu výrazně nižší, neboť ani po 60 minutách ošetření nedošlo k úplnému vyhubení bakteriálních kolonií. Je ovšem důležité podotknout, že výše zkoumaná plazmová tryska pracovala na šestkrát vyšším výkonu než MiniJet a zároveň byla umístěna o 3 mm blíže ošetřovaným sporám. Srovnání účinků těchto dvou přístrojů tak opět nabízí důkaz

pro existence závislosti mezi velikostí výkonu a baktericidními účinky plazmatu. Avšak na základě příliš velkého rozdílu mezi časy ošetření a jiné vzdálenosti od ošetřované oblasti, nehledě na jiný typ použitého *Bacillu subtilis*, nelze s jistotou říci, který z těchto dvou přístrojů je v celkovém pohledu účinnější.

Vedle toho práce Takemura a spol. (2014) [51] zkoumala baktericidní účinky argonové plazmové trysky (frekvence zdroje 16 - 20kHz) na sporách druhu *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) rovnoměrně rozprostřených na filtru ze skleněných vláken o průměru 25 mm. Filtry byly ošetřovány ve vzdálenosti 10 mm od konce plazmového výboje po dobu 0 - 400 s. Výsledky ošetření ukázaly pokles bakteriální populace o necelé dva řády (přibližně 98%).

I v porovnání s touto prací se účinky MiniJetu naměřené v této práci jeví nízké. Avšak znovu je zde potřeba zdůraznit, že se jedná o porovnání dvou plazmových trysek odlišných parametrů, které ošetřovaly sice stejný druh spor *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), ale připravených jinými postupy a v různých koncentracích.

Cílem této práce bylo studium plazmatického aplikátoru PAzk a MiniJetu PM - 10.R pro potenciální využití obou přístrojů v medicíně. Na základě výsledků experimentálního měření baktericidních účinků a porovnání obou přístrojů je nyní možné navrhnout oblasti jejich potenciálního využití v rámci medicíny.

Na základě vysoké fokusace plazmového výboje s poměrně dobrou účinností a možností kontaktního i bezkontaktního způsobu ošetření je MiniJet vhodným kandidátem zejména pro využití účinků netermálního plazmatu ve stomatologii. Jak již bylo zmíněno v Kapitole 1, v rámci zubního lékařství jsou studovány potenciální aplikace NTP především pro dezinfekci zubních kanálků a dutiny ústní a modifikaci povrchů zubních implantátů. Malé rozměry plazmové trysky (155x33 mm) jsou navíc vhodné i pro manipulaci s přístrojem uvnitř dutiny ústní.

Naproti tomu plazmatický aplikátor PAzk, který je už svou konstrukcí určen pouze pro bezkontaktní ošetření a zároveň díky rozptylové mřížce umožňuje ošetření větších ploch až o velikosti 1 963 mm<sup>2</sup>, by mohl být vhodným přístrojem pro využití zejména v dermatologii při ošetřování chronických ran nebo zánětlivých kožních onemocnění. Díky bezkontaktnímu způsobu ošetření zde nehrozí nebezpečí poranění kůže způsobené příliš vysokou teplotou výboje, popřípadě vlivem elektrického proudu. Navíc velká aktivní oblast umožňuje rovnoměrné ošetřování i větších úseků kůže.

# Závěr

Tato práce se zabývala studiem záporného korónového výboje a plazmové trysky s cílem navrhnout možná využití obou těchto přístrojů v medicíně.

V teoretické části práce byl nejprve představen pojem netermálního plazmatu, uvedeny jeho základní charakteristiky a stručně představeny dosavadní výzkumy a výsledky využití netermálního plazmatu pro medicínské účely. Dále byly klasifikovány hlavní typy zdrojů netermálního plazmatu s důrazem na korónový výboj a implementaci zdrojů NTP v podobě plazmových trysek. Závěrem teoretické části byly okrajově popsány možné způsoby interakce netermálního plazmatu s bakteriálními buňkami.

Experimentální část práce se zabírala popisem fyzikálních a technických parametrů a měřením baktericidních účinků MiniJetu PM - 10.R a plazmatického aplikátoru PAzk, které byly vybrány jako zástupci plazmových trysek a aplikátorů se záporným korónovým výbojem, jejichž studium bylo tématem této bakalářské práce. K měření baktericidních účinků obou přístrojů byl vybrán referenční protokol [5] z roku 2015, jenž byl sestaven na Loughboroughské univerzitě ve Spojeném království. Shrnutí fyzikálních a technických parametrů MiniJetu a plazmatického aplikátoru PAzk je zaznamenáno v tabulce 4.1. Naměřené baktericidní účinky obou přístrojů pak byly prezentovány formou fotografií ošetřených bakteriálních kultur, viz. obrázky 5.3 a 5.4.

Výsledky experimentální části práce byly následně využity k porovnání MiniJetu PM - 10.R a plazmatického aplikátoru PAzk a toto porovnání bylo dále diskutováno v souvislosti s využitím obou přístrojů pro medicínské účely.

Na základě dat získaných v rámci této práce byla jako nejvhodnější medicínská oblast pro potenciální využití MiniJet Pm - 10.R vybrána stomatologie, konkrétně čištění zubních kanálků a dutiny ústní a modifikace povrchů zubních implantátů. V případě plazmatického aplikátoru PAzk se na základě jeho vlastností a parametrů ukázalo jako potenciálně nejvhodnější uplatnění při ošetřování chronických ran a zánětlivých kožních onemocnění, tedy v oblasti dermatologie.

V návaznosti na tuto práci by bylo vhodné zopakovat experimentální měření baktericidních účinků obou studovaných plazmatických aplikátorů a to nejen v otevřeném, ale i v uzavřeném objemu, pro získání většího množství informací o jejich interakci s bakteriálními buňkami.

# Literatura

- [1] LAROUSSE, Mounir. Cold Plasma in Medicine and Healthcare: The New Frontier in Low Temperature Plasma Applications. *Frontiers in Physics* [online]. 2020, 8 [cit. 2021-12-05]. ISSN 2296-424X. Dostupné z: doi:10.3389/fphy.2020.00074
- [2] VON WOEDTKE, Th., H.-R. METELMANN a K.-D. WELTMANN. Clinical Plasma Medicine: State and Perspectives of in Vivo Application of Cold Atmospheric Plasma. *Contributions to Plasma Physics* [online]. 2014, 54(2), 104-117 [cit. 2021-12-05]. ISSN 08631042. Dostupné z: doi:10.1002/ctpp.201310068
- [3] SCHOLTZ, Vladimír, Jarmila PAZLAROVA, Hana SOUSKOVA, Josef KHUN a Jaroslav JULAK. Nonthermal plasma — A tool for decontamination and disinfection. *Biotechnology Advances* [online]. 2015, 33(6), 1108-1119 [cit. 2021-11-19]. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2015.01.002
- [4] MOON, Ik Jun a Chong Hyun WON. Review of the Current State of Medical Plasma Technology and its Potential Applications. *Medical Lasers* [online]. 2018, 7(1), 1-5 [cit. 2021-11-19]. ISSN 2287-8300. Dostupné z: doi:10.25289/ML.2018.7.1.1
- [5] SHAW, A, P SERI, C A BORGHI, G SHAMA a F IZA. A reference protocol for comparing the biocidal properties of gas plasma generating devices. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2015, 48(48) [cit. 2021-8-16]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/48/48/484001
- [6] LIAO, Xinyu, Donghong LIU, Qisen XIANG, Juhee AHN, Shiguo CHEN, Xingqian YE a Tian DING. Inactivation mechanisms of non-thermal plasma on microbes: A review. *Food Control* [online]. 2017, 75, 83-91 [cit. 2021-11-28]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2016.12.021
- [7] LU, P., P.J. CULLEN a K. OSTRIKOV. Atmospheric Pressure Non-thermal Plasma Sources. *Cold Plasma in Food and Agriculture* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 83-116 [cit. 2021-11-18]. ISBN 9780128013656. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801365-6.00004-4
- [8] KULHÁNEK, P., J. HAVLÍČEK a D. BŘEŇ. ASTROFYZIKA: Plazmový vesmír | Co je to plazma? *ALDEBARAN* [online]. 2018 [cit. 2021-11-09]. Dostupné z: <https://www.aldebaran.cz/astrofyzika/plazma/basics.php>
- [9] BÁRDOS, L. a H. BARÁNKOVÁ. Cold atmospheric plasma: Sources, processes, and applications. *Thin Solid Films* [online]. 2010, 518(23), 6705-6713 [cit. 2021-10-24]. ISSN 00406090. Dostupné z: doi:10.1016/j.tsf.2010.07.044
- [10] WELTMANN, Klaus Dieter, Eckhard KINDEL, Thomas VON WOEDTKE, Marcel HÄHNEL, Manfred STIEBER a Ronny BRANDENBURG. Atmospheric-pressure plasma sources: Prospective

- tools for plasma medicine. *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2010, 82(6), 1223-1237 [cit. 2021-8-16]. ISSN 1365-3075. Dostupné z: doi:10.1351/PAC-CON-09-10-35
- [11] NEHRA, Vijay, Ashok KUMAR a H. K. DWIVEDI. Atmospheric Non-Thermal Plasma Sources. *International Journal of Engineering* [online]. 2008, 2(1), 53-68 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.517.5732&rep=rep1&type=pdf>
- [12] DASAN, Beyhan Gunaydin, Baran ONAL-ULUSOY, Joanna PAWLAT, Jaroslaw DIATCZYK, Yasin SEN a Mehmet MUTLU. A New and Simple Approach for Decontamination of Food Contact Surfaces with Gliding Arc Discharge Atmospheric Non-Thermal Plasma. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2017, 10(4), 650-661 [cit. 2021-11-28]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-016-1847-2
- [13] KHUN, Josef a Vladimír SCHOLTZ. Nízkoteplotní plazma VII: srážky v plazmatu III. *ALDEBARAN BULLETIN* [online]. AGA (Aldebaran Group for Astrophysics), 2013, 22.2.2013, 11(8) [cit. 2021-12-08]. ISSN 1214-1674. Dostupné z: [https://www.aldebaran.cz/bulletin/2013\\_08\\_pla.php](https://www.aldebaran.cz/bulletin/2013_08_pla.php)
- [14] KUBEŠ, Pavel. Impulsní silnoprůdové výboje a jejich diagnostika [online]. Praha, 2004 [cit. 2021-12-08]. Dostupné z: <https://www.aldebaran.cz/studium/vyboje.pdf>. Studijní text pro doktorské studium. Fakulta elektrotechnická, ČVUT.
- [15] KHUN, Josef a Vladimír SCHOLTZ. Nízkoteplotní plazma V: srážky v plazmatu. *ALDEBARAN BULLETIN* [online]. AGA (Aldebaran Group for Astrophysics), 2012, 21.12. 2012, 10(47) [cit. 2021-12-08]. ISSN 1214-1674. Dostupné z: [https://www.aldebaran.cz/bulletin/2012\\_47\\_pla.php](https://www.aldebaran.cz/bulletin/2012_47_pla.php)
- [16] KHUN, Josef a Vladimír SCHOLTZ. Nízkoteplotní plazma VI: srážky v plazmatu II. *ALDEBARAN BULLETIN* [online]. AGA (Aldebaran Group for Astrophysics), 2013, 25.1.2013, 11(4) [cit. 2021-12-08]. ISSN 1214-1674. Dostupné z: [https://www.aldebaran.cz/bulletin/2013\\_04\\_vla.php](https://www.aldebaran.cz/bulletin/2013_04_vla.php)
- [17] NORBERG, Seth A, Eric JOHNSEN a Mark J KUSHNER. Formation of reactive oxygen and nitrogen species by repetitive negatively pulsed helium atmospheric pressure plasma jets propagating into humid air. *Plasma Sources Science and Technology* [online]. 2015, 24(3) [cit. 2021-11-28]. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/24/3/035026
- [18] MOISAN, M, J BARBEAU, S MOREAU, J PELLETIER, M TABRIZIAN a L'H YAHIA. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2001, 226(1-2), 1-21 [cit. 2021-11-15]. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-5173(01)00752-9
- [19] SCHOLTZ, Vladimír a Josef KHUN. Nízkoteplotná plazma VIII: Chémia plazmy. *ALDEBARAN BULLETIN* [online]. AGA (Aldebaran Group for Astrophysics), 2013, 26.4.2013, 11(15) [cit. 2021-12-08]. ISSN 1214-1674. Dostupné z: [https://www.aldebaran.cz/bulletin/2013\\_15\\_pla.php](https://www.aldebaran.cz/bulletin/2013_15_pla.php)
- [20] TANAKA, Hiromasa a Masaru HORI. Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* [online]. 2017, 60(1), 29-32 [cit. 2021-12-05]. ISSN 0912-0009. Dostupné z: doi:10.3164/jcbrn.16-67

- [21] PALDRYCHOVÁ, Martina a Jana MICHAILIDU. PŮSOBENÍ NÍZKOTEPLTNÍHO PLAZMATU NA MIKROORGANISMY. *BIOPROSPECT* [online]. 2018, 28(3), s. 64-67 [cit. 2021-12-05]. ISSN 2570-8910. Dostupné z: [http://bts.vscht.cz/sites/default/files/Bioprospect\\_3\\_2018\\_2.pdf](http://bts.vscht.cz/sites/default/files/Bioprospect_3_2018_2.pdf)
- [22] MACHKOVÁ, Anna. *Perspektivy dezinfekčních účinků nízkoteplotního plazmatu při paliativní onkologické léčbě* [online]. Praha, 2020 [cit. 2021-9-24]. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10467/90243>. Diplomová práce. Fakulta jaderná a fyzikálně inženýrská, ČVUT.
- [23] ISBARY, Georg, Tetsuji SHIMIZU, Yang-Fang LI, Wilhelm STOLZ, Hubertus M THOMAS, Gregor E MORFILL a Julia L ZIMMERMANN. Cold atmospheric plasma devices for medical issues. *Expert Review of Medical Devices* [online]. 2014, 10(3), 367-377 [cit. 2021-8-16]. ISSN 1743-4440. Dostupné z: doi:10.1586/erd.13.4
- [24] TIEDE, R., J. HIRSCHBERG, G. DAESCHLEIN, T. VON WOEDTKE, W. VIOEL a S. EMERT. Plasma Applications: A Dermatological View. *Contributions to Plasma Physics* [online]. 2014, 54(2), 118-130 [cit. 2021-9-24]. ISSN 08631042. Dostupné z: doi:10.1002/ctpp.201310061
- [25] LU, X, M LAROUSI a V PUECH. On atmospheric-pressure non-equilibrium plasma jets and plasma bullets. *Plasma Sources Science and Technology* [online]. 2012, 21(3) [cit. 2021-10-28]. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/21/3/034005
- [26] Plasma isn't just plasma!: Various basic technologies for the generation of cold atmospheric plasma. *Plasmawise* [online]. [cit. 2021-9-24]. Dostupné z: <https://www.plasmawise.com/technology/plasma-discharges/>
- [27] GLOSÁŘ ALDEBARAN: Korónový výboj. *ALDEBARAN* [online]. [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://www.aldebaran.cz/glossary/print.php?id=718>
- [28] WESSELS, Wessel. What Is St Elmo's Fire? *OWN YOUR WEATHER* [online]. 2020 [cit. 2021-10-5]. Dostupné z: <https://ownyourweather.com/st-elmos-fire/>
- [29] Corona Effect on a transmission Line. *Electrical Equipment* [online]. [cit. 2021-10-5]. Dostupné z: <https://engineering.electrical-equipment.org/electrical-distribution/types-partial-discharges-gases.html>
- [30] ZHANG, Tongkai, Yu ZHANG, Qizheng JI, Ben LI a Jiting OUYANG. Characteristics and underlying physics of ionic wind in dc corona discharge under different polarities. *Chinese Physics B* [online]. 2019, 28(7) [cit. 2021-11-04]. ISSN 1674-1056. Dostupné z: doi:10.1088/1674-1056/28/7/075202
- [31] CHUDOBA, Ondřej. *Tři úlohy z fyzikálního praktika* [online]. Brno, 2008 [cit. 2021-12-28]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/pfbsx/bp.pdf>. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav fyziky kondenzovaných látek.
- [32] KHUN, Josef, Jana JIREŠOVÁ, Lucie KUJALOVÁ, Pavel HOZÁK a Vladimír SCHOLTZ. Comparing the biocidal properties of non-thermal plasma sources by reference protocol. *The European Physical Journal D* [online]. 2017, 71(10) [cit. 2021-8-16]. ISSN 1434-6060. Dostupné z: doi:10.1140/epjd/e2017-80115-9

- [33] AKISHEV, Yu, M GRUSHIN, I KOCHETOV, V KARAL'NIK, A NAPARTOVICH a N TRUSHKIN. Negative corona, glow and spark discharges in ambient air and transitions between them. *Plasma Sources Science and Technology* [online]. 2005, 14(2), S18-S25 [cit. 2021-8-16]. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/14/2/S03
- [34] WINTER, J, R BRANDENBURG a K-D WELTMANN. Atmospheric pressure plasma jets: an overview of devices and new directions. *Plasma Sources Science and Technology* [online]. 2015, 24(6) [cit. 2021-8-16]. ISSN 0963-0252. Dostupné z: doi:10.1088/0963-0252/24/6/064001
- [35] LUNOV, Oleg, Vitalii ZABLOTSKII, Olexander CHURPITA, Ales JÄGER, Leoš POLÍVKA, Eva SYKOVÁ, Alexandr DEJNEKA a Šárka KUBINOVÁ. The interplay between biological and physical scenarios of bacterial death induced by non-thermal plasma. *Biomaterials* [online]. 2016, 82, 71-83 [cit. 2021-11-28]. ISSN 01429612. Dostupné z: doi:10.1016/j.biomaterials.2015.12.027
- [36] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie : Bakteriologie, virologie, parazitologie* Praha: Marvil, 1996 [cit. 2021-10-1].
- [37] PIGGOT, P.J. Bacillus Subtilis. *Encyclopedia of Microbiology* [online]. Elsevier, 2009, 2009, s. 45-56 [cit. 2021-8-16]. ISBN 9780123739445. Dostupné z: doi:10.1016/B978-012373944-5.00036-5
- [38] HUANG, Yaohua, Xiaofei P YE, Christopher J DOONA, Florence E FEEHERRY, Mark RADOSEVICH a Siqun WANG. An investigation of inactivation mechanisms of Bacillus amyloliquefaciens spores in non-thermal plasma of ambient air. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. 2018, 99(1), 368-378 [cit. 2021-11-28]. ISSN 0022-5142. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.9198
- [39] DOBRYNIN, Danil, Gregory FRIDMAN, Gary FRIEDMAN a Alexander FRIDMAN. Physical and biological mechanisms of direct plasma interaction with living tissue. *New Journal of Physics* [online]. 2009, 11(11) [cit. 2021-12-29]. ISSN 1367-2630. Dostupné z: doi:10.1088/1367-2630/11/11/115020
- [40] LUNOV, O., O. CHURPITA, V. ZABLOTSKII, et al. Non-thermal plasma mills bacteria: Scanning electron microscopy observations. *Applied Physics Letters* [online]. 2015, 106(5) [cit. 2021-12-29]. ISSN 0003-6951. Dostupné z: doi:10.1063/1.4907624
- [41] EHLBECK, J, U SCHNABEL, M POLAK, J WINTER, Th VON WOEDTKE, R BRANDENBURG, T VON DEM HAGEN a K-D WELTMANN. Low temperature atmospheric pressure plasma sources for microbial decontamination. *Journal of Physics D: Applied Physics* [online]. 2011, 44(1) [cit. 2021-12-29]. ISSN 0022-3727. Dostupné z: doi:10.1088/0022-3727/44/1/013002
- [42] SMOLKOVÁ, Barbora, Mariia UZHYTCHAK, Anna LYNNYK, Šárka KUBINOVÁ, Alexandr DEJNEKA a Oleg LUNOV. A Critical Review on Selected External Physical Cues and Modulation of Cell Behavior: Magnetic Nanoparticles, Non-thermal Plasma and Lasers. *Journal of Functional Biomaterials* [online]. 2019, 10(1) [cit. 2021-12-30]. ISSN 2079-4983. Dostupné z: doi:10.3390/jfb10010002
- [43] PAKOSTOVÁ, Eva. *Extremofilní mikroorganismy* [online]. Brno, 2007 [cit. 2021-12-29]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/y5e7g/Bakalarska\\_prace.pdf](https://is.muni.cz/th/y5e7g/Bakalarska_prace.pdf). Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Ústav biochemie.
- [44] DOSTÁL, Jiří a kol. *LÉKAŘSKÁ CHEMIE II: Bioorganická chemie* [online]. Brno: MASARYKOVA UNIVERZITA, Lékařská fakulta, 2011 [cit. 2021-12-01]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/med/podzim2013/BLLC0111p/um/Lekarska\\_chemie\\_II\\_2011.pdf](https://is.muni.cz/el/med/podzim2013/BLLC0111p/um/Lekarska_chemie_II_2011.pdf)



- [45] ALKAWAREEK, Mahmoud Y., Sean P. GORMAN, William G. GRAHAM a Brendan F. GILMORE. Potential cellular targets and antibacterial efficacy of atmospheric pressure non-thermal plasma. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 2014, 43(2), 154-160 [cit. 2021-12-30]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.08.022
- [46] Microwave Generator and MiniJets for Microwave Plasmas. 4. verze. HEUERMANN HF-Technik GmbH [online]. listopad 2019, [cit. 2021-12-11]. Dostupné z: [https://hhft.de/wp-content/uploads/2021/01/Datasheet\\_MiniJet10W.pdf](https://hhft.de/wp-content/uploads/2021/01/Datasheet_MiniJet10W.pdf)
- [47] LEROUGE, S., A. C. FOZZA, M. R. WERTHEIMER, R. MARCHAND a L'H. YAHIA. Sterilization by Low-Pressure Plasma: The Role of Vacuum-Ultraviolet Radiation. *Plasmas and Polymers* [online]. 5(1), 31-46 [cit. 2021-11-28]. ISSN 10840184. Dostupné z: doi:10.1023/A:1009504209276
- [48] KUMARI, B. L., P. SUDHAKAR, K. HEMAMALINI, N. S. SREE a P. VIJETHA. Studies on pectinase production by *Bacillus subtilis* using agro-industrial wastes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* [online]. 2014, leden 2014, 5(6), str. 330 - 339 [cit. 2021-11-09]. ISSN 0975-8585. Dostupné z: [http://rjpbcs.com/pdf/2014\\_5\(6\)/\[48\].pdf](http://rjpbcs.com/pdf/2014_5(6)/[48].pdf)
- [49] MiniJets and associated 10 W generator - Non-Thermal Atmospheric Plasma. *HHF* [online]. [cit. 2022-01-02]. Dostupné z: <https://hhft.de/10w-minijet>
- [50] HERTWIG, Christian, Veronika STEINS, Kai REINEKE, Antje RADEMACHER, Michael KLOCKE, Cornelia RAUH a Oliver SCHLÜTER. Impact of surface structure and feed gas composition on *Bacillus subtilis* endospore inactivation during direct plasma treatment. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, 6 [cit. 2022-01-04]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.00774
- [51] TAKEMURA, Yuichiro, Shungo UMEJI, Ketaro ITO, Seito FURUYA a M. FURUTA. Inactivation Treatment of Bacterial Spores Contaminated Spices by Atmospheric Plasma Jet. *Plasma Medicine* [online]. 2014, 4(1-4), 89-100 [cit. 2022-01-04]. ISSN 1947-5764. Dostupné z: doi:10.1615/PlasmaMed.2014011969